

DESARROLLO DE UN MULTIBIOSENSOR DE ADN PARA EL DIAGNÓSTICO TEMPRANO DE CÁNCER DE MAMA

Tesis para optar al grado de Doctora en Bioquímica

LAURA GARCÍA CARRASCOSA

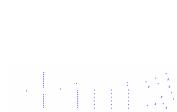
Dirigida por Prof. Laura M. Lechuga

Tutor: Catedrático José M. Cuezva

Presentada ante el Departamento de Biología Molecular de la
Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid



Llevada a cabo en el Instituto de Microelectrónica de Madrid del
Centro Nacional de Microelectrónica (IMM-CNM-CSIC) y en el
Centro de Investigación en Nanociencia y Nanotecnología
(CIN2:CSIC-ICN)



Madrid, Junio 2008

A mis padres

*Si buscas resultados distintos,
no hagas siempre lo mismo.*

Albert Einstein

SUMMARY

This Thesis describes the development of a new methodology based on label-free biosensing to detect multiple mutations within a gene. As proof of concept it has been chosen the BRCA1 gene, which is related to early onset of inherited breast cancer.

Two different biosensing technologies, Nanomechanical and Surface Plasmon Resonance (SPR) biosensors have been evaluated as an alternative tool to routine analytical methods for the detection of DNA point mutations.

For setting up an optimised biosensor method for this type of diagnostics, the following issues have been addressed:

- *The enhancement of DNA immobilization onto gold surfaces at both biosensing platforms:* It has been used the well-known method of thiol self-assembly monolayers to immobilize DNA sequences in a controlled way. Three different thiol groups have been evaluated to test DNA linking to the gold surface in order to maximize quimisorption and minimize fisisorption phenomena, leading to highly dense DNA receptor monolayers.
- *The enhancement of hybridization onto DNA monolayers surfaces at both biosensing platforms:* Different strategies, as the use of lateral and vertical spacers, have been tested to control the self-assembly method and to improve target accessibility, leading to higher hybridization efficiency.
- *Evaluation of both biosensing platforms for DNA detection:* Detection of 12 and 25 mer DNA sequences have been tried. Only SPR biosensor were able to detect hybridization and to discriminate a single mismatch within a sequence. Nanomechanical biosensors that use a single microcantilever as transducer were unable to differentiate between a fully complementary sequence and a non-complementary one. For the nanomechanical biosensor a reference cantilever must be used in order to compensate other events not related to hybridization which could hide the detection of the specific hybridization. On the other hand, SPR biosensors were able to detect 12 mer and 25 complementary sequences with a 10 nM and 100 nM limit of detection, respectively. In addition, a clear discrimination of a single mismatch was demonstrated. Therefore this biosensing method was chosen for setting up a multianalyte label-free detection format.

- *Set-up of a multi-analyte detection format able to discriminate a single mismatched in PCR like products:* A methodology of DNA immobilization of multiple receptor sequences, based on the simultaneous co-immobilization of two and four different sequences related to BRCA1 gene have been tried. Sequential detection of several *PCR like* target products using the same DNA monolayer was demonstrated, addressing a detection limit at the nM range (50 nM).

The main goal of this Thesis has been the demonstration of the ability of the SPR biosensor system for DNA detection and discrimination of single mismatches through a multiplex format. The multiplex detection format has never been described before. The establishment of this methodology, as well as its ability to address a limit of detection in the nM range, sets a landmark in the direct and label-free detection of DNA by biosensor devices. This allocates the biosensor technology as a competitive and complementary tool for DNA analysis.

ÍNDICE

1. MOTIVACIÓN Y OBJETIVOS.....	5
2. ESTRUCTURA.....	9
3. INTRODUCCIÓN.....	11
3.1 Biosensores	11
3.1.1. INTRODUCCIÓN.....	11
3.1.2 TIPOS DE BIOSENSORES.....	14
3.1.3 BIOSENSORES ÓPTICOS.....	20
3.1.3.1 Biosensor de resonancia de plasmón superficial.....	22
3.1.4 BIOSENSORES NANOMECAÑICOS.....	26
3.1.5 BIOSENSORES DE ADN.....	30
3.2 Inmovilización de biomoléculas sobre superficies biosensoras de oro ...	36
3.3 Detección precoz de cáncer de mama hereditario.....	42
3.3.1. IMPORTANCIA DE LA GENÉTICA EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER.....	42
3.3.1.1 Susceptibilidad genética y cáncer.....	44
3.3.1.2 Tipos de mutaciones involucradas en cáncer.....	45
3.3.2 GENÉTICA DEL CÁNCER DE MAMA HEREDADO	48
3.3.2.1 Implicación de los genes BRCA1 y BRCA2.....	49
3.3.2.2 El gen BRCA1.....	51
a) Estructura, expresión y función.....	51
b) Mutaciones más frecuentes en el BRCA-1.....	53
3.3.2.3 Evaluación de riesgo genético en el cáncer de mama hereditario..	54
3.3.3 TEST GENÉTICOS ACTUALES PARA LA DETECCIÓN DE MUTACIONES EN LOS GENES BRCA1 Y BRCA2.....	58

4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
4.1	Selección de secuencias de ADN y preparación de muestras reales de pacientes con cáncer de mama heredado.....	64
4.1.1	SECUENCIAS DE ADN DE CARÁCTER GENÉRICO.....	64
4.1.2	SECUENCIAS DE ADN TIPO PCR PORTADORAS DE MUTACIONES EN EL GEN BRCA-1.....	65
4.2	Descripción de los sistemas biosensores empleados.....	69
4.2.1	BIOSENSOR DE RESONANCIA DE PLASMÓN SUPERFICIAL (SPR).....	69
4.2.2	BIOSENSOR NANOMECÁNICO.....	73
4.3	Técnicas <i>ex-situ</i> empleadas para apoyo a la caracterización de la inmovilización e hibridación de ADN en biosensores.....	75
4.3.1	FLUORESCENCIA.....	75
4.3.2	MARCAJE RADIOACTIVO.....	77
4.3.3	ESPECTROSCOPIA FOTOELECTRÓNICA DE RAYOS X (XPS).....	77
4.4	Protocolos de inmovilización y hibridación.....	79
4.4.1	BIOSENSOR SPR.....	80
4.4.2	BIOSENSORES NANOMECÁNICOS.....	81
4.4.3	TÉCNICAS EX-SITU	82
5	RESULTADOS.....	83
5.1	Caracterización de los procesos de inmovilización e hibridación en biosensores SPR y nanomecánicos.....	83
5.1.1	CONDICIONES DE INMOVILIZACIÓN.....	83
5.1.2	CONDICIONES DE HIBRIDACIÓN.....	96
5.1.3	OPTIMIZACIÓN DE LA DETECCIÓN POR MEJORA DE LA ACCESIBILIDAD.....	98
5.2	Condiciones para la detección de mutaciones en SPR.....	105
5.3	Detección en SPR de mutaciones vinculadas al BRCA-1.....	109
5.3.1	FORMATO DE DETECCIÓN DE UN ÚNICO ANALITO.....	110
5.3.2	FORMATO DE DETECCIÓN MULTI-ANALITO.....	112

6.	DISCUSIÓN.....	123
6.1	Optimización de las condiciones de inmovilización e hibridación en biosensores.....	123
6.1.1	SELECCIÓN DEL GRUPO FUNCIONAL. IMPORTANCIA DE LOS PROCESOS DE QUIMI/FISIADSORCIÓN EN LA RESPUESTA BIOSENSORA.....	125
6.1.2	OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE HIBRIDACIÓN. ACCESIBILIDAD DE LA SECUENCIA DIANA.....	131
6.2	Selección de un sistema biosensor para la detección de mutaciones.....	136
6.3	Optimización de condiciones de detección de mutaciones.....	137
6.3.1	DETECCIÓN DE DESAJUSTES DE UNA SOLA BASE.....	137
6.3.2	DETECCIÓN DE MUTACIONES EN PRODUCTOS TIPO PCR.....	139
6.4	Importancia del desarrollo de un formato multianalito con biosensores SPR para la detección de mutaciones en el ADN.....	146
7.	CONCLUSIONES.....	149
8.	LÍNEAS DE FUTURO.....	153
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	157
10.	ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	173
11.	PUBLICACIONES	179
12.	AGRADECIMIENTOS	185



MOTIVACIÓN Y OBJETIVOS

*“Antes pensábamos que nuestro futuro estaba en las estrellas.
Ahora sabemos que está en nuestros genes”.*

James Watson.

Desde hace décadas son muchos los avances en biotecnología que han proporcionado un mayor conocimiento de los procesos bioquímicos involucrados en el origen y desarrollo de las diferentes enfermedades que afectan al ser humano. Una de los mayores logros ha sido la demostración del papel que la genética de cada individuo juega en el desarrollo potencial de las enfermedades, así como la identificación y caracterización de los genes que actúan en enfermedades con un componente genético. De entre ellas algunos tipos de cáncer, como el cáncer de mama, presentan en muchos casos un marcado carácter hereditario que otorga a ciertos individuos, portadores de determinadas mutaciones, una mayor susceptibilidad a su desarrollo.

La clave para comprender estas enfermedades genéticas está en la identificación de la mutación causal y en la caracterización de los genes que participan en su desarrollo, de forma tal que se pueda diagnosticar la predisposición antes de que se manifieste la enfermedad. Sin embargo para identificar de estas mutaciones se necesita recurrir de forma paralela a un conjunto de técnicas cuyo manejo clínico es de elevada complejidad y que conllevan diversas limitaciones.

Este trabajo de Tesis tiene su motivación en la necesidad de desarrollar nuevas metodologías que permitan detectar la hibridación de ADN y la identificación de mutaciones puntuales en tiempo real, sin requerimientos de marcajes y con una alta sensibilidad, de forma que puedan establecerse como métodos alternativos o complementarios a las metodologías actuales.

En este contexto los dispositivos biosensores se plantean como una excelente alternativa dada su alta sensibilidad permitiendo realizar la monitorización en tiempo real sin necesidad de emplear marcajes fluorescentes o radiactivos.

El **objetivo principal** de este trabajo de Tesis es proponer y validar dispositivos biosensores, concretamente los de tipo nanomecánicos y los de

tipo resonancia de plasmón superficial, para la detección de mutaciones con aplicación en detección precoz de cáncer de mama hereditario. Estas dos alternativas biosensoras han sido escogidas debido a dos criterios fundamentales:

- i) El biosensor de SPR representa una técnica sólida y robusta ampliamente utilizada en el ámbito de la investigación y de la industria. Su principio de funcionamiento y su capacidad de detección de biomoléculas con alta sensibilidad ha sido demostrado para multitud de analitos, pero en el campo de la genómica son escasos los trabajos que demuestran su aplicabilidad. Por este motivo, desarrollar una metodología que permita detectar mutaciones con esta plataforma constituye un reto en si mismo de gran interés.
- ii) El biosensor nanomecánico ha generado grandes expectativas como herramienta de detección con elevada sensibilidad, teóricamente superior a la del SPR, aunque se trata de un sistema biosensor muy reciente y de eficacia escasamente comprobada. En el campo del ADN existen algunos trabajos puntuales pero no se ha desarrollado ninguno que demuestre de forma exhaustiva y analítica su aplicabilidad en la detección de hibridación de ADN y de detección de mutaciones puntuales. Por este motivo, la optimización de esta metodología también constituye otro importante reto.

El estudio de esta Tesis se centrará únicamente en mutaciones presentes en el gen BRCA1, del que se ha demostrado que confiere una mayor susceptibilidad al desarrollo del cáncer de mama.

Con esta metodología se espera poder acortar singularmente el tiempo de análisis de las técnicas de rutina, permitiendo obtener resultados además de cualitativos (sí/no es portador de la mutación), cuantitativos a partir de una muestra de tejido o una muestra en suero por lo que se llevará a cabo un estudio en profundidad del grado de viabilidad de estas técnicas para su uso en la detección de cáncer heredado de mama.

En el desarrollo de la metodología se utilizarán en primer lugar muestras sintéticas para la puesta a punto de la metodología necesaria y finalmente, muestras reales obtenidas de linfocitos de pacientes diagnosticados con esta enfermedad.

Los *objetivos específicos* que se han tenido que considerar para la consecución del objetivo global son los siguientes:

1. Optimización de un procedimiento de inmovilización de secuencias de ADN en superficies de oro. Se tendrán en cuenta aspectos como la elección de la modificación adecuada para su unión covalente a la superficie, el uso de espaciadores, y las condiciones óptimas relativas al

proceso de inmovilización que maximicen la señal de hibridación de secuencias de ADN sintéticas.

2. Desarrollo de protocolos de hibridación que permitan la discriminación entre secuencias complementarias y portadoras de mutaciones. Se emplearán secuencias de ADN sintéticas de pequeño tamaño y secuencias sintéticas tipo PCR de mayor tamaño, vinculadas al gen BRCA-1.

3. Optimización y desarrollo de estos protocolos de inmovilización para ampliarlos a un formato tipo multianálisis, que permitan la inmovilización y detección de múltiples secuencias de forma simultánea.

4. Evaluación de dos plataformas biosensoras: biosensores nanomecánicos y biosensores de resonancia de plasmon superficial, para desarrollar una aplicación de detección directa de ADN al diagnóstico precoz de cáncer de mama hereditario.

5. Desarrollo y optimización de procesos de hibridación y detección para permitir la identificación de cuatro mutaciones vinculadas al gen BRCA-1. Este proceso se llevará a cabo con la plataforma biosensora que ofrezca las mejores prestaciones y posibilidades para el análisis en las condiciones previamente optimizadas.



ESTRUCTURA

Atendiendo a los objetivos anteriormente expuestos, esta Tesis se estructura con el siguiente esquema:

- *Introducción:* Se da una visión global de la metodología biosensora con un enfoque particular en los biosensores de resonancia de plasmón superficial y los biosensores nanomecánicos. Asimismo se da una visión global de la fenomenología y la genética del cáncer de mama hereditario, detallando las metodologías y estrategias actuales empleadas para la detección de mutaciones en el gen BRCA1.

Materiales y Métodos: Se detallan todas las técnicas y protocolos empleados en la realización de cada uno de los experimentos necesarios para la consecución de los objetivos planteados. Se describen además en detalle los montajes experimentales de los dispositivos biosensores empleados.

Resultados: Se muestran los resultados obtenidos durante las etapas de caracterización de los procesos de inmovilización e hibridación para conseguir el objetivo de detectar mutaciones en ADN por medio de ambas técnicas biosensoras. Se justifica la elección de la plataforma biosensora más adecuada para la detección de mutaciones y se muestra el desarrollo de los protocolos que permiten la detección de mutaciones vinculadas al BRCA1. La optimización anterior permite el desarrollo de un sistema de detección en formato multianálisis que identifica cuatro mutaciones en el BRCA1. Un esquema de la estrategia empleada en la consecución de los resultados se muestra en la Figura E1.

Discusión: Se analizan y discuten los resultados más relevantes de la Tesis y el interés que implican, de acuerdo con los objetivos planteados y comparado con lo descrito en la literatura.

Conclusiones: Se resumen en conjunto los resultados alcanzados

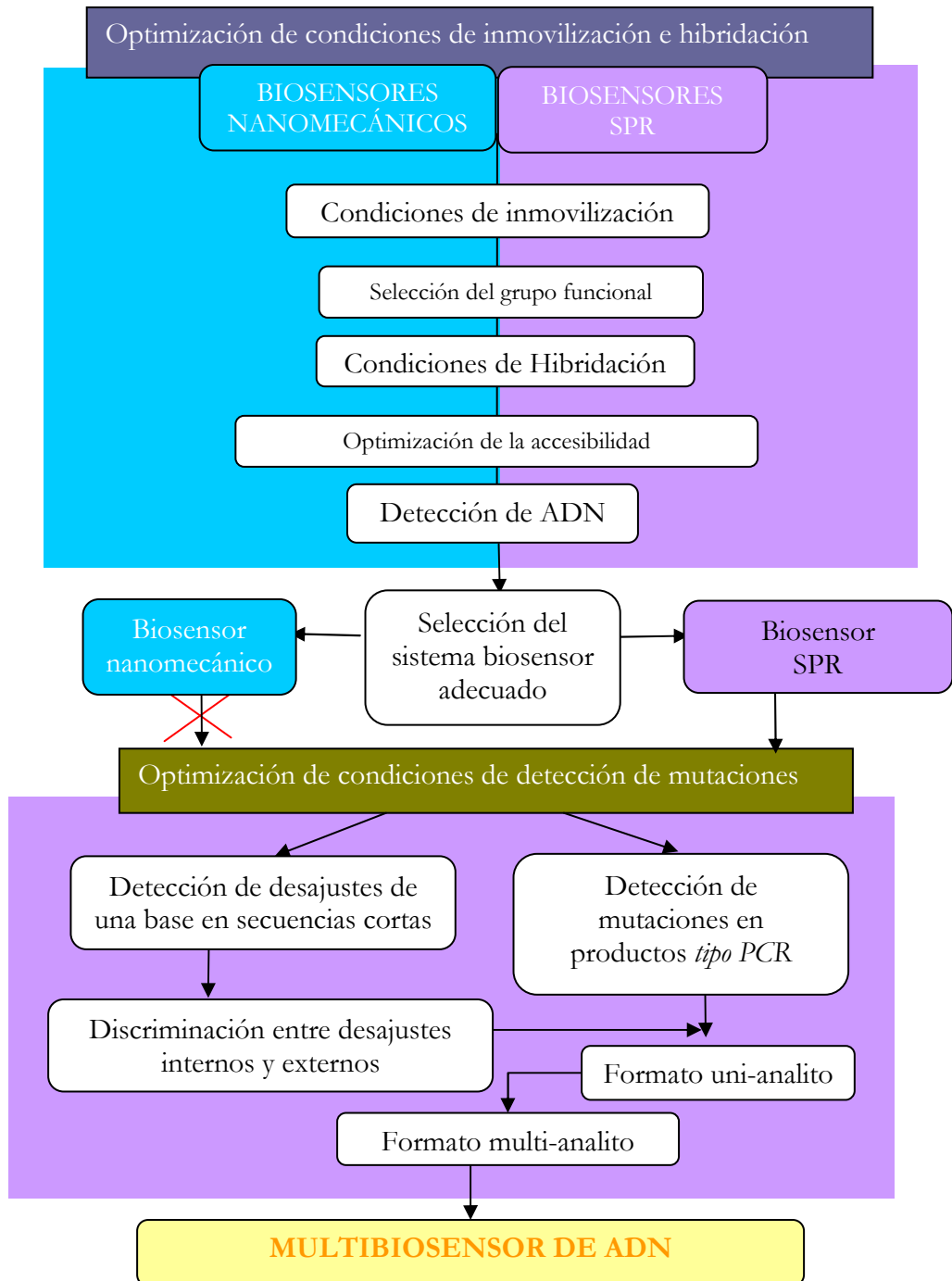


Figura E1. Esquema de la estrategia empleada para la consecución de los objetivos planteados en la Tesis y que resume los resultados obtenidos.



INTRODUCCIÓN

3.1 Biosensores

3.1.1 INTRODUCCIÓN

Todos los seres vivos estamos constituidos por el mismo tipo de moléculas que son responsables de lo que conocemos como vida. Las biomoléculas interactúan entre sí y se asocian para cumplir funciones esenciales y de diversa naturaleza en los seres vivos que regulan todos los procesos vitales, incluidos el de la comunicación entre las células, la inmunidad, la reproducción, la diferenciación, el envejecimiento o la actividad hormonal. Estos procesos de interacción se llevan a cabo mediante un proceso de reconocimiento inter-biomolecular altamente selectivo, por lo que cada molécula tiene su *complementaria*, a la que se une de forma específica.

La naturaleza ha desarrollado un amplio conjunto de biomoléculas y estructuras biomoleculares que muestran una gran selectividad en el reconocimiento de alguna propiedad particular, lo que permite su unión con una determinada molécula de entre un conjunto o una mezcla de ellas. Esta capacidad de reconocimiento y unión específica, inherente a muchos tipos de biomoléculas, tales como anticuerpos, proteínas de diversa naturaleza, o ADN, entre otros, ofrece una oportunidad para explotar sus características exclusivas y desarrollar dispositivos que permitan la detección de sustancias por las que éstas presentan una capacidad de interacción específica.

Gracias a este principio de reconocimiento inter-biomolecular tuvo su aparición el primer dispositivo biosensor en el año 1962 [1]: un sistema *artificial* capaz de detectar glucosa por medio de la interacción de ésta con la enzima que participa en su metabolismo (glucosa-oxidasa), y que estaba previamente depositada en el sistema biosensor.

El principio de funcionamiento de este dispositivo pionero, al que denominaron en un principio electrodo-enzima de enzyme-electrode era muy sencillo, ya que consistía en un electrodo combinado con unas membranas que contenían la enzima específica permitiendo detectar la glucosa. Este dispositivo biosensor conseguía así *mimetizar* la acción biológica al incorporar dentro del mismo las enzimas que degradan la glucosa, con un electrodo que es el encargado de *traducir* dicha degradación en un valor de concentración de glucosa en sangre. Poco después en 1965 Kadish y Hall [2], y en 1967 Updike

y Hicks [3, 4] describieron una variante de este método para detectar glucosa: la enzima glucosa oxidasa se mantenía atrapada en un electrodo de oxígeno mediante una membrana de diálisis o de poliacrilamida y la disminución de la presión de oxígeno disuelto era proporcional a la concentración de glucosa. El éxito de estos trabajos culminó con la comercialización de este sistema de detección en 1975 [5], permitiendo su acceso a todos los diabéticos, tal y como se sigue haciendo hoy en día.

En términos generales un biosensor se puede definir como un dispositivo capaz de *traducir* la reacción de reconocimiento molecular del analito de interés, comúnmente denominado ligando, con su receptor específico en una señal que pueda ser medida y cuantificada. Este proceso, denominado **transducción**, implica que el mecanismo de detección se lleva a cabo por parte de un receptor que debe estar inmovilizado en el área sensora del dispositivo, el cual, se encuentra a su vez íntimamente ligado al sistema transductor. Cuando en un dispositivo biosensor tiene lugar el reconocimiento biológico entre el receptor y el ligando, se producen cambios en diferentes parámetros físico-químicos, tales como cambios de masa, de potencial, de intensidad luminosa, etc, que pueden ser medidos o registrados por el sistema transductor, de forma que se genere una señal asociada a dicha magnitud, y que es proporcional a la concentración de la sustancia a analizar.

Por tanto un dispositivo biosensor permite medir, cuantificar y analizar en tiempo real un proceso de interacción entre biomoléculas. Los dos constituyentes del biosensor, receptor y transductor, forman una unidad funcional, cuya selectividad viene dada por la parte biológicamente activa [6]. La sensibilidad se consigue mediante un mecanismo de transducción adecuado (Figura I1). De esta forma, los biosensores proporcionan lo que se podría denominar, una *integración temporal*, en el sentido de que permite realizar un proceso de medida química directa generando una señal continua y reversible, además de una *integración espacial*, que favorece la miniaturización.

Una de las características inherentes a los biosensores, que los hace particularmente atractivos es la posibilidad de realizar el análisis de la sustancia a determinar en tiempo real y de forma directa (sin necesidad de marcador). Este hecho los diferencia de cualquier análisis biológico o clínico convencional que requiere siempre un marcador (ya sea colorimétrico, fluorescente o radioactivo) y confiere a los biosensores la posibilidad de realizar no sólo un análisis cualitativo (sí/no) y cuantitativo (nivel de concentración), sino también la posibilidad de evaluar la cinética de la interacción (constante de afinidad, asociación, disociación,...) [7-9].

Desde la aparición de los primeros biosensores prácticamente cualquier dispositivo bio-analítico de detección de moléculas que surgía era

campo del diagnóstico clínico [12] pero la biotecnología ha permitido extender su utilización a otros sectores como el medioambiental, el farmacéutico, el agroalimentario, el químico o el militar, ya que es posible obtener receptores biológicos para un elevado número de sustancias: fármacos, toxinas, agentes patógenos de la guerra química, alimentos, hormonas, pesticidas o disruptores endocrinos, por citar algunos de los más relevantes.

La amplia variedad de transductores y receptores susceptibles de emplearse en biosensores convierte este campo en un área multidisciplinar, donde el diseño de sistemas integrados y de metodologías para incrementar la sensibilidad, estabilidad, selectividad y manufactura son puntos clave que se están desarrollando continuamente.

3.1.2. TIPOS DE BIOSENSORES

Los biosensores pueden ser clasificados en base a numerosos criterios. Una primera clasificación, en función del *tipo de receptor inmovilizado*, (Tabla I1) permite diferenciar los distintos tipos de biosensores según tengan inmovilizado moléculas de ADN, proteínas (enzimas, anticuerpos, péptidos...), o bien una molécula artificial, como polinucleótidos basados en enlace peptídico (PNA) [13-15], ribozimas [16] o polímeros de huella molecular [17, 18] o incluso, un sistema biológico complejo, como una célula o un tejido [19, 20].

El tipo de componente biológico inmovilizado condiciona y da esencia al tipo de aplicación para la cual el biosensor está dirigido. Asimismo, condiciona el *tipo de reacción que puede tener lugar entre el receptor y el analito* y que condiciona el formato mediante el cual se lleva a cabo su detección: (i) exclusivamente basado en la afinidad entre ambos o (ii) en el que el analito, además puede sufrir otras reacciones químicas/bioquímicas. Esto nos lleva a introducir una segunda clasificación entre los biosensores según éstos sean catalíticos o de afinidad:

i) **Biosensores catalíticos:** En ellos durante el reconocimiento molecular se produce además una modificación química del analito, que permite su detección. Se produce un consumo continuo de sustrato por el biocatalizador inmovilizado en el sensor y el transductor puede medir el producto formado o el sustrato consumido. Los más utilizados son los biosensores enzimáticos. Las enzimas son proteínas que catalizan las reacciones bioquímicas en los seres vivos.

Según la reacción catalizada las enzimas más empleadas en aplicaciones biosensoras se pueden agrupar en: oxidorreductasas (transfieren electrones), hidrolasas (hidrolizan enlaces) y liasas (forman dobles enlaces con moléculas). El tipo de enzima utilizada en un biosensor depende de la estabilidad que presente frente a los factores que controlan la actividad enzimática, tales como el pH, la fuerza iónica o la temperatura.

La mayoría de los biosensores enzimáticos disponibles comercialmente utilizan enzimas oxidorreductasas como elemento de reconocimiento debido a su elevada estabilidad. La reacción catalítica enzimática es eficiente y extremadamente selectiva, por lo que se combinan dos factores necesarios para la mayoría de las aplicaciones analíticas. El carácter catalítico de la interacción hace que en su reacción con el sustrato las enzimas se regeneren a su estado inicial y no sea necesario ningún tipo de tratamiento para reestablecer el biosensor. Se consigue así una monitorización continua y reversible, lo que no siempre ocurre con otro tipo de material biológico, como es el caso de los anticuerpos. La mayor desventaja de estos sistemas son que resultan más caros producir, por el requerimiento adicional de aislar la enzima y que éstas, una vez aisladas no son siempre estables y a menudo necesitan cofactores para mantener su actividad

Tabla II: Clasificación de los biosensores según el receptor biológico y el transductor empleado en su construcción.

RECEPTOR BIOLÓGICO	
<i>Enzimas</i>	
<i>Anticuerpos</i>	Monoclonales
	Policlonales
	Recombinantes
<i>Sistemas completos</i>	microorganismos
	secciones de tejidos
	células
<i>ADN</i>	
TRANSDUCTOR	
<i>Electroquímicos</i>	Amperométricos
	Potenciométricos
	Conductimétricos
<i>Ópticos</i>	Absorción
	Fluorescencia
	Onda evanescente (refractométricos)
<i>Mecano-acústicos</i>	Piezoelectrónicos
	Nanomecánicos

Una versión de estos sistemas, propone el uso de secciones de tejidos celulares para alargar la vida del biosensor ya que las enzimas o sistemas multi-enzimáticos contenidos en su interior mantienen una mayor actividad y permanecen estables durante más tiempo al estar en su medio natural [21]. Pero los principales inconvenientes son su baja sensibilidad, su elevado tiempo de respuesta y su limitada selectividad.

También cabe resaltar el papel catalítico de otros sistemas como los bacterianos o celulares para medir el consumo o producción de un determinado analito. Los sistemas más utilizados son los bacterianos, los fúngicos, las células procedentes de organismos superiores y los protozoos. Se pueden acoplar a distintos tipos de transductores y son capaces de detectar compuestos relacionados con el crecimiento (vitaminas, azúcares, ácidos orgánicos) o bien aquellos que inhiben la respiración microbiana, como contaminantes ambientales y sustancias tóxicas [22, 23].

El mayor inconveniente del uso de células completas es que la difusión de los sustratos y los productos a través de la membrana celular da lugar a una respuesta más lenta comparada con la de los sensores enzimáticos y la menor especificidad debido a que las reacciones pueden ser catalizadas por otras enzimas presentes en la célula.

ii) ***Biosensores de afinidad***: El proceso de reconocimiento molecular basado en la afinidad característica de un ligando con su receptor produce un cambio físico-químico que puede ser detectado y cuantificado por el sistema transductor (Figura I2).

El ejemplo más significativo lo constituye el grupo de los inmunosensores: biosensores capaces de detectar compuestos mediante reacciones inmunológicas. Su mecanismo de reconocimiento es similar al de los inmunoensayos [12, 24] ya que utilizan el formato de las reacciones antígeno-anticuerpo para detectar la presencia del analito en la muestra. Se diferencian de los inmunoensayos en que no es necesario utilizar sistemas de amplificación de la señal, son capaces de reconocer con la suficiente sensibilidad y selectividad al analito, y proporciona respuestas de forma rápida y continua, en tiempo real y de manera reversible permitiendo en muchos casos la realización de múltiples medidas. Como el acoplamiento antígeno-anticuerpo no genera productos detectables es necesario utilizar técnicas de transducción basadas en detectar cambios asociados al proceso de la interacción en sí, tales como pequeños cambios de masa, medir la modificación de las propiedades ópticas o evaluar la producción de señales eléctricas asociadas a dicho acoplamiento.

En la mayoría de los casos la especificidad y afinidad de la interacción antígeno-anticuerpo determina la selectividad y sensibilidad del sensor. Uno de los mayores retos que deben superar este tipo de biosensores es el de garantizar la especificidad en la detección del analito minimizando las uniones no específicas. La afinidad de la interacción también determina la

reversibilidad de la reacción y debe asegurarse la disociación del complejo antígeno-anticuerpo mediante la utilización de agentes de regeneración que no alteren la estructura del anticuerpo en su capacidad de reconocimiento.

Variantes a este esquema vienen dadas por el uso de otros receptores de naturaleza distinta al anticuerpo. Un ejemplo son los polímeros de huella molecular (MIPs): matrices sintetizadas artificialmente capaces de detectar determinados compuestos mediante la reproducción del mecanismo de reconocimiento de los sistemas biológicos (hormona-receptor, enzima-sustrato, antígeno-anticuerpo) [25, 26]. Los biosensores basados en MIPs presentan una sensibilidad y selectividad elevadas, un tiempo de vida largo y pueden desarrollarse para diversos analitos, pero existen todavía bastantes inconvenientes sin superar: el procedimiento de síntesis es bastante laborioso y requiere múltiples etapas, el tiempo de análisis suele ser alto debido a las bajas constantes de afinidad entre el MIP y el analito. Aún así se trata de una tecnología en desarrollo con aplicaciones prometedoras [27]. Otros sistemas de afinidad son los biosensores de ADN, donde la inmovilización de una hebra de ADN en el área sensora permitiría la detección de su complementaria mediante el proceso de hibridación [28-35]. La utilización de este tipo de biosensores es aún escasa y su éxito dependerá en gran medida de la capacidad para llevar a cabo la detección múltiple de cientos de secuencias con un mismo biosensor y de conseguir dispositivos lo suficientemente sensibles como para que no sean necesarios procesos de amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [31-33, 36].

Las moléculas de ADN inmovilizadas pueden también detectar proteínas, de forma similar a como hacen los anticuerpos cuando su naturaleza es la de un aptámeros [37, 38]. Las moléculas de ADN son de gran interés para monitorizar interacciones entre hebras de ADN y proteínas implicadas en procesos de replicación y transcripción, tales como factores de transcripción o enzimas nucleares como las polimerasas, ligasas, etc.

Los biosensores también se pueden clasificar según el *sistema transductor empleado*, y por tanto, el principio físico subyacente en el fenómeno de la transducción. Éste último se encuentra íntimamente ligado al sistema detector que es el que permite monitorizar los cambios que el transductor registra como consecuencia de los procesos de reconocimiento molecular y/o catalíticos que tienen lugar en la superficie biosensora. Es el transductor, el que determina la eficacia en el procesado de la señal del biosensor.

En cuanto a los tipos de sistemas transductores que se pueden usar en los biosensores podemos citar (Tabla 1):

- i) **Ópticos:** Detectan la reacción de reconocimiento a través de cambios producidos en alguna de las propiedades de la luz, ya sea a través de la longitud de onda, intensidad (por cambios en la absorción o dispersión) o velocidad (cambios en el índice de refracción) [9, 39].

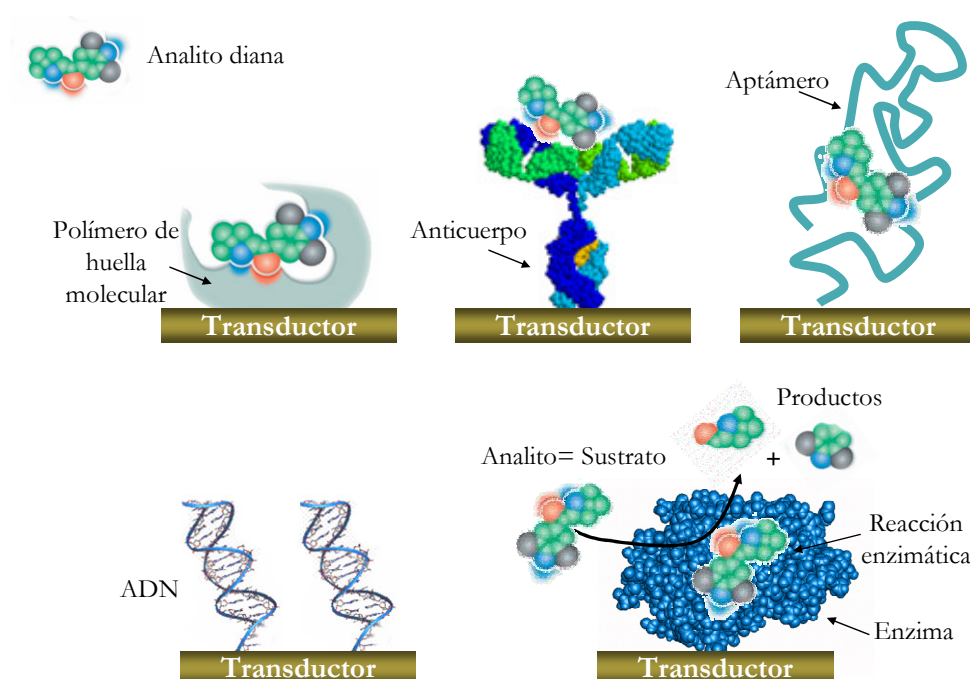


Figura I2. Principales tipos de biosensores según el receptor biológico. Se muestra de forma esquemática el principio de reconocimiento de los biosensores basados en polímeros de huella molecular, en interacción antígeno-anticuerpo, en aptámeros, en hibridación de ADN y los biosensores de basados en enzimas.

- ii) **Electroquímicos:** Registran el cambio electroquímico que se produce como consecuencia de la reacción de reconocimiento molecular, que es proporcional a la concentración del analito que se desea detectar [10, 40]. Se diferencian varios tipos:
 - a) Amperométricos: Determinan corrientes eléctricas asociadas con los electrones involucrados en los procesos red-ox [4, 41, 42].
 - b) Potenciométricos: Emplean electrodos selectivos a ciertos iones para determinar cambios en la concentración de los iones escogidos (ej. H^+) [43].
 - c) Conductimétricos: Miden cambios en la conductancia asociados con cambios en el ambiente iónico de las soluciones [44].
- iii) **Mecano-acústicos** (acústicos, micro/nanomecánicos): Detectan cambios de masa a través de una microbalanza formada por un cristal piezoeléctrico. Un caso particular dentro de estos transductores son los micro/nanomecánicos, que emplean micropalanca semejantes a las del microscopio de fuerzas atómicas (AFM). En estos últimos además de

detectar cambios de masa a través de la variación de su frecuencia de resonancia, se pueden detectar los cambios de tensión superficial que tienen lugar en la superficie de la micropalanca como consecuencia de los fenómenos de reconocimiento molecular [45, 46].

Para el desarrollo de un dispositivo que funcione correctamente resulta crucial, además de la elección de un material biológico y de un método de inmovilización adecuados, escoger un sistema de transducción óptimo. Los factores que influyen en la elección del transductor son: facilidad de fabricación, miniaturización, estabilidad y resistencia. De todos los sistemas transductores anteriormente detallados, puede decirse que son los dispositivos electroquímicos, especialmente los de tipo enzimáticos, los más utilizados como transductores en biosensores. Esto es debido a ventajas que presentan:

a) Las medidas electroquímicas pueden ser realizadas en volúmenes pequeños, incluso del orden de nanolitros, con relativa facilidad debido a la naturaleza interfacial de la medida electroquímica. Esto hace que tales dispositivos sean especialmente apropiados para la monitorización “*in vivo*”.

b) La señal obtenida es eléctrica, y permite la transducción directa de la reacción en la señal de lectura.

c) Los límites de detección que se obtienen, (normalmente entre 10^{-9} y 10^{-6} mol \cdot l $^{-1}$), son suficientes y adecuados para la detección de numerosos analitos de interés.

d) La relativa simplicidad y el bajo coste de la instrumentación electroquímica permiten una fácil disponibilidad de estos dispositivos.

Pero los sensores electroquímicos tienen dos importantes inconvenientes: poseen una baja selectividad, y es necesario utilizar un electrodo de referencia que mantenga constante el potencial durante el transcurso de la medida durante un largo período de tiempo.

Los biosensores potenciométricos poseen la ventaja de ser fácilmente miniaturizables gracias a la tecnología microelectrónica y se denomina transistores de efecto ionosensibles (ISFET). Se han llegado incluso a utilizarse *in vivo* en operaciones quirúrgicas y actualmente son comercializados ampliamente.

Durante los últimos años son los biosensores ópticos los que se están imponiendo como tecnología con un mayor nivel de sensibilidad y proyección. Los biosensores ópticos presentan indudables ventajas con respecto a los electroquímicos, como, la no necesidad de usar electrodos de referencia, carencia de ruido eléctrico, posibilidad de efectuar medidas a diferentes longitudes de onda o la posibilidad de trabajar en medios agresivos donde los electroquímicos no son operativos. Además poseen una gran estabilidad mecánica y tamaño y peso muy reducidos [9, 39].

Los transductores micro/nanomecánicos irrumpieron en el campo de los biosensores a partir del año 2000 debido a una publicación[47] donde se demostraba que podían alcanzar un elevado grado de sensibilidad con un formato sencillo de detección y de implementación para el desarrollo de dispositivos matriciales de varias micropalancas [47]. Desde entonces se ha abierto una gran expectativa entorno a las posibilidades de desarrollo y aplicabilidad de estos biosensores contando incluso hoy en día con algún modelo en el mercado. Sin embargo, estos biosensores presentan importantes retos desde el punto de vista tecnológico y de conocimiento del principio físico de su funcionamiento, por lo que a pesar de las expectativas iniciales su utilización se ha visto seriamente frenada en los últimos años.

Dentro de los biosensores ópticos, es sin duda el basado en la Resonancia de Plasmón Superficial el que desde hace décadas ha mostrado una aplicabilidad y fiabilidad indiscutible. Su mayor exponente, el biosensor comercial BIACORE, ha sido empleado ampliamente en investigación mostrando excelentes resultados en muy diferentes áreas [48].

Nuestro grupo de investigación tiene una amplia experiencia en el campo de los biosensores ópticos y nanomecánicos, y ha sido pionero en el desarrollo de algunos de ellos a nivel nacional e internacional. Su actividad se centra en el desarrollo de biosensores ópticos (dispositivos Mach Zehnder, SPR), magneto-ópticos y nanomecánicos (dispositivos de una única palanca, matriciales y basados en micropalancas ópticas). En la actualidad cuenta con una empresa, spin-off nacida del trabajo de investigación en el mismo, denominada SENSIA S.L. (Grupo Genetrix). Actualmente, SENSIA S.L. comercializa una versión de dispositivo biosensor de resonancia de plasmón superficial (β -SPR) con elevadas prestaciones.

De entre todas las plataformas posibles se han elegido las plataformas biosensoras nanomecánicas y de resonancia de plasmón, para analizar su viabilidad y aplicabilidad como dispositivos que permitan la detección de mutaciones en el gen BRCA1, para su uso en detección precoz de cáncer de mama heredado. Los biosensores nanomecánicos se han elegido por su teórico límite de sensibilidad que lo convierte en una interesante alternativa para detección de ADN, mientras que el SPR se escoge por su elevada robustez; además de por tener dos plataformas propias, una de ellas comercial, y una amplia experiencia investigadora tanto en biosensores nanomecánicos como de resonancia de plasmón.

3.1.3 BIOSENSORES ÓPTICOS.

Los biosensores ópticos detectan la reacción de reconocimiento a través de cambios producidos en características de la luz, ya sea a través de la longitud de onda, intensidad (por cambios en la absorción o dispersión) o velocidad (cambios en el índice de refracción). Pueden ser de dos tipos en

función del modo en que la luz es guiada dentro del área sensora y según su forma de interaccionar con el complejo ligando-receptor:

- i) los basados en guías de onda [49-51], en los que generalmente una fibra óptica se utiliza para conducir la luz al área sensora y es posteriormente recogida a su salida, tras interaccionar con el complejo ligando-receptor. En estos sensores, la interacción del ligando con su receptor inmovilizado produce un cambio en las propiedades ópticas de la luz guiada debido a fenómenos de emisión, absorción, fluorescencia, cambios de índice de refracción, bioluminiscencia o dispersión.
- ii) Los basados en campos evanescentes, hacen uso de la forma particular en que las ondas electromagnéticas se pueden confinar en determinados medios, dieléctricos o metálicos. Los biosensores ópticos de esta segunda clase comparten dos características: la utilización de algún tipo de modo electromagnético guiado y el principio de detección de campo evanescente (Figura I3).

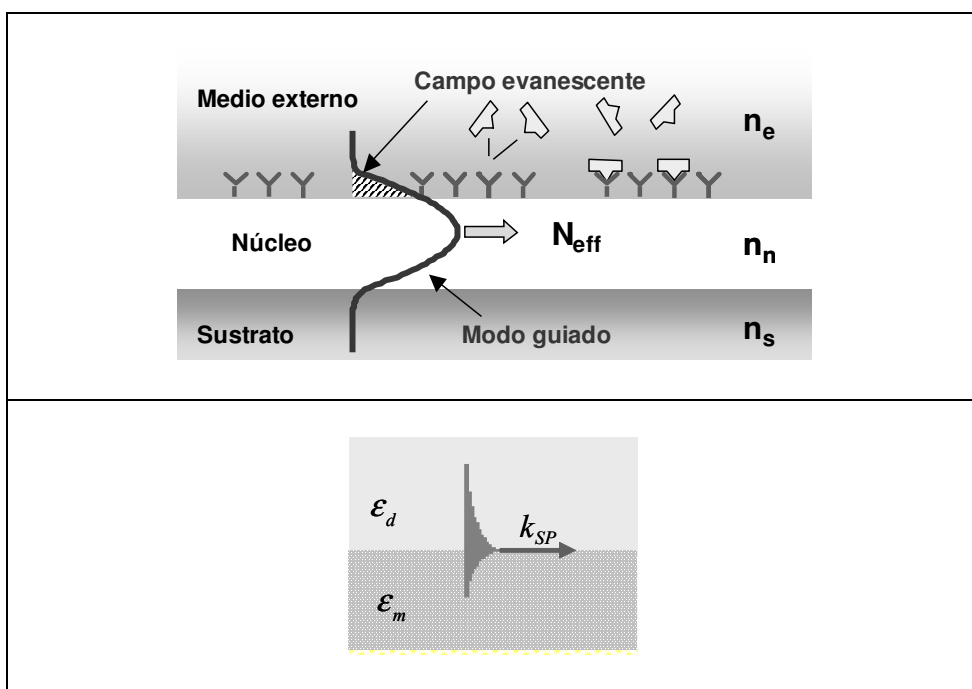


Fig. I3: (arriba) Guía de ondas convencional. Se observa cómo el campo evanescente del modo guiado puede interactuar con el medio externo y (abajo) distribución del campo electromagnético de un plasmón superficial

Existen dos modos de guiar y confinar las ondas electromagnéticas: i) mediante guías de onda convencionales, como es el caso de los interferómetros Mach-Zehnder (MZI) [52-54] ó ii) en la intercara de un dieléctrico y un metal, como es el ejemplo de los biosensores de

resonancia de plasmón superficial (SPR) [55-57]. En ambos casos una parte del campo electromagnético, el campo evanescente, penetra en el medio externo. El campo evanescente es máximo en las proximidades de la superficie y decae exponencialmente a medida que se aleja de ésta presentando una distancia de penetración que puede oscilar entre unos pocos nanómetros y algunas micras, según el diseño, la configuración del sensor y la longitud de onda empleada. La generación de un campo evanescente ofrece una alternativa idónea para la detección de analitos en la superficie del metal o de la guía de onda mediante la monitorización de cambios ópticos en el medio (absorción, dispersión, índice de refracción...), contando además con la ventaja de evitar fenómenos de interferencia que pueda derivarse de otras sustancias que no se encuentren próximas a la superficie.

3.1.3.1 El Biosensor de Resonancia de Plasmón Superficial.

Los biosensores ópticos basados en la Resonancia de Plasmón Superficial (SPR, del inglés Surface Plasmon Resonance) son uno de los sistemas utilizados con más frecuencia en la monitorización de interacciones biomoleculares [39, 57, 58]. Su versatilidad permite que puedan ser aplicados al estudio de todo tipo de uniones, desde las más conocidas antígeno-anticuerpo o ligando-receptor [57], hasta hibridaciones de ADN [28-31, 34]. Además proporcionan ventajas no sólo sobre los métodos convencionales de análisis, sino también sobre otro tipo de biosensores, al no requerir marcajes para detectar la interacción. A estas características se añade la posibilidad de la medida de forma directa y en tiempo real, lo cual permite evaluar la cinética de la interacción (constantes de afinidad, asociación y disociación) [59, 60].

El fenómeno conocido como resonancia de plasmón superficial fue introducido por Kretschmann y Raether en 1968 [61], pero no fue hasta 1983 cuando Liedberg, Nylander y Lundström describieron por primera vez sus aplicaciones en la detección de interacciones biomoleculares [62]. Desde entonces la técnica de SPR se ha convertido en un método de referencia. Las publicaciones científicas dedicadas a biosensores de SPR aumentan todos los años y cada vez existe un mayor número de compañías que comercializan estos dispositivos.

El principio físico de los biosensores de SPR es el fenómeno óptico producido por la oscilación de cargas en la interfaz de un metal y un dieléctrico [63]. La excitación de los plasmones de superficie (oscilaciones colectivas de los electrones del metal) se consigue cuando un rayo de luz polarizado P incide en dicha interfase a un determinado ángulo de incidencia denominado *ángulo de resonancia*. Cuando se produce la resonancia es posible observar un mínimo en la intensidad de la luz reflejada, que se representa

mediante una curva que relaciona el ángulo de incidencia con respecto a la reflectividad.

Para que los plasmones de superficie se exciten es necesario alcanzar la condición de resonancia, es decir, los vectores de propagación del plasmón de superficie (\mathbf{k}_{sp}) y de las ondas electromagnéticas incidentes ($\mathbf{k}_{x,d}$) deben ser iguales. Cuando el acoplamiento entre los vectores de ondas tiene lugar, el componente paralelo a la superficie ($\mathbf{k}_{x,d}$) debe verificar la condición de resonancia:

$$k_{xd} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_d} \cdot \sin \theta = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{\epsilon_m \cdot \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}}$$

donde θ es el ángulo de incidencia, ϵ_m es la constante dieléctrica del metal y ϵ_d es la constante dieléctrica del prisma. Esta ecuación muestra que la propagación de la resonancia de plasmón superficial sólo puede producirse si $\epsilon_m < -\epsilon_d$ (Figura I4.), es decir, si la permeabilidad dieléctrica del metal y del medio dieléctrico son de signo opuesto. Para alcanzar esta condición es necesario utilizar metales como oro o plata, a frecuencias situadas entre el infrarrojo y la parte visible del espectro. El grosor de la capa de metal es crítico para el valor del mínimo de reflectancia y depende de las constantes ópticas del medio y de la longitud de onda de la luz incidente [63]. Para el oro, el grosor óptimo es 45 nm a una longitud de onda de 790 nm.

La característica más interesante de este fenómeno, desde el punto de vista de sus posibles aplicaciones analíticas, es que el ángulo al que se produce la resonancia es muy sensible a las variaciones del índice de refracción del medio adyacente a la superficie del metal. De modo que cualquier cambio de índice de refracción, como el producido por una interacción biomolecular, puede ser detectado mediante la variación de la posición angular a la que tiene lugar el fenómeno de resonancia (cambio del ángulo de resonancia de plasmón). Los sensores de SPR pueden ser dispositivos altamente sensibles para detectar interacciones bioespecíficas utilizando superficies previamente funcionalizadas con el receptor adecuado para detectar un determinado analito.

Normalmente existen dos formas de excitación óptica para conseguir la condición de resonancia: la reflexión total en estructuras acopladas a un prisma [64, 65] y la difracción en redes de difracción [66]. La primera se conoce como configuración de Kretschmann y es la más empleada debido a su simplicidad. La configuración de Kretschmann permite utilizar dos modos de medida siguiendo la variación del ángulo de acoplamiento de resonancia o la variación de la intensidad de luz reflejada a ángulo fijo (Figura I5.).

Para medir en el primer modo es necesario que la muestra y el detector se encuentren fijos en una plataforma rotatoria y la condición de

resonancia se observa como un mínimo agudo en la reflectancia de la luz cuando el ángulo de incidencia varía. Durante una interacción biomolecular se produce un cambio en la curva de resonancia que se puede relacionar cuantitativamente con el analito que se ha detectado. El inconveniente de este método es que las medidas no se muestran en tiempo real ya que es necesario registrar las curvas de resonancia completas cuando el proceso ya ha tenido lugar.

En el segundo modo de medida se pueden medir los cambios en el índice de refracción, cuando se producen seleccionando previamente el ángulo de incidencia a media distancia del mínimo de resonancia (en la zona de mayor pendiente de las curvas y por tanto de mayor sensibilidad) y midiendo la intensidad de la luz reflejada a ángulo fijo. Este modo de medida permite detectar los cambios en el índice de refracción en el mismo instante en que se están produciendo, por lo que resulta ideal para la detección de interacciones moleculares en tiempo real.

La resolución en índice de refracción de los sensores de SPR con acoplamiento por prisma está entre 10^{-5} y 10^{-6} RIU (unidades de índice de refracción, de inglés refractive index units) [65]. Esto significa que el límite de detección actual de los dispositivos de SPR está en 1 pg/mm^2 de material analizado.

El primer sensor comercial fue lanzado por BIAcore AB (Uppsala, Suecia) en 1990 con el nombre de *BIAcore 1000*, a este le siguieron otros dispositivos, cada uno con diferentes grados de automatización y especificación de parámetros [67]. Posteriormente otras compañías han desarrollado diferentes versiones, entre las que se encuentra el biosensor β -SPR desarrollado por la empresa SENSIA S.L. a partir de la investigación desarrollada en nuestro grupo de investigación.

Los biosensores SPR pueden detectar reacciones de reconocimiento en un intervalo muy amplio de pesos moleculares, de velocidades de unión y de afinidad.

Con respecto al peso molecular, los sensores de SPR son capaces de determinar de modo directo interacciones moleculares que se produzcan por encima de unos pocos cientos de dalton [68]. En términos de afinidad se han descrito intervalos efectivos que comprenden desde el nivel sub-picomolar al milimolar [69]. Las únicas limitaciones del empleo de intervalos de afinidad muy altos o muy bajos se deben a la dificultad para disociar las uniones moleculares y a la capacidad para diferenciar entre uniones específicas e inespecíficas. Estos inconvenientes se podrían subsanar mediante la selección de disoluciones de regeneración apropiadas para romper las uniones de alta afinidad o a través de la adopción de sistemas de referencia, en el caso de las interacciones de baja afinidad.

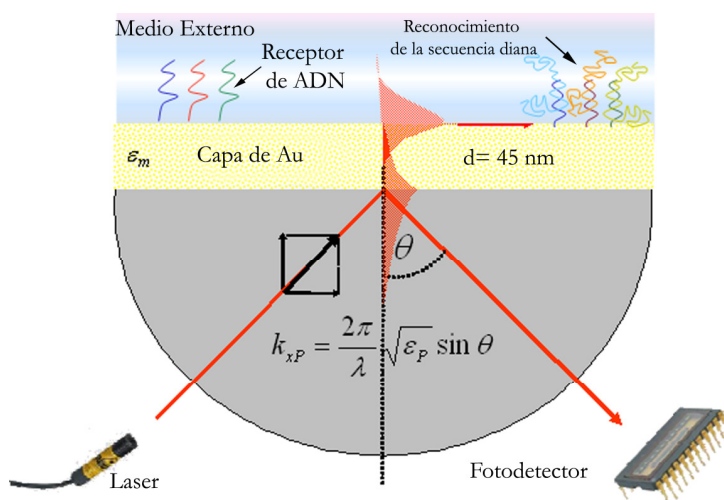


Figura I4. Representación esquemática de la configuración de un sensor de SPR (k = vector de onda de la luz incidente, θ = ángulo de incidencia, ϵ = constante dieléctrica).

Las principales *ventajas* que proporciona la utilización de los sensores de SPR son:

- Rapidez y continuidad de las medidas.
- Versatilidad: es posible la detección de un número elevado de analitos siempre que esté disponible una molécula receptora hacia la que presenten afinidad
- Reversibilidad: relacionada con la estabilidad y recuperación del sistema y que permite que las medidas pueden repetirse sin necesidad de cambiar la superficie sensora.
- Ausencia de requerimiento de marcadores moleculares: la unión entre moléculas puede observarse directamente sin la necesidad de marcadores de ningún tipo.

Pero presentan también algunas limitaciones:

- Especificidad de la detección: si la densidad y compactación de la monocapa utilizada como elemento de reconocimiento no es la idónea pueden aparecer fenómenos de reactividad cruzada con moléculas diferentes a las que se quiere determinar.

- Interferencia de efectos indeseables: debido a que los sensores de SPR son sensibles a cualquier efecto que produzca una variación del índice de refracción, fluctuaciones de temperatura o la distinta composición de la muestra líquida pueden influir en la detección de la respuesta específica del sensor.

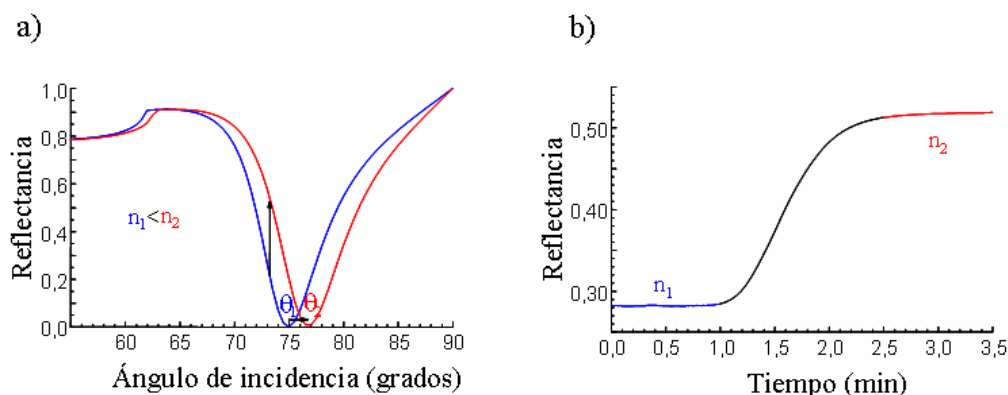


Figura I5. a) Respuesta del sensor de SPR al cambio de índice de refracción midiendo la intensidad de luz reflejada en función del ángulo de incidencia y b) en función del tiempo a un ángulo de incidencia fijo.

3.1.4 BIOSENSORES NANOMECAÑICOS

Los sensores nanomecánicos surgen hacia 1994 como una nueva familia de sensores, en los que el sistema físico de transducción consiste en una micropalanca de silicio fija en uno de sus extremos (ver Figura I6) [45]. Tienen su origen en el Microscopio de Fuerzas Atómicas (AFM) [70] y gracias al desarrollo de esta tecnología se comenzaron a utilizar de forma rutinaria los transductores micro-mecánicos.

La expansión de las técnicas de AFM demostró la sensibilidad de las micropalancas de silicio para detectar la fuerza entre un par de moléculas biológicas complementarias, tales como la interacción de proteínas (avidina/biotina) [71], la hibridación entre cadenas complementarias de ADN [72], o el reconocimiento antígeno-anticuerpo [73]. La medida se lleva a cabo mediante la funcionalización de la punta de la micropalanca con moléculas complementarias a las presentes en la superficie de un sustrato.

Los biosensores nanomecánicos están basados en los mismos mecanismos de detección que el microscopio de fuerzas atómicas, pero en este caso la micropalanca tanto el sustrato sobre el que se inmovilizan los receptores biológicos como el propio sistema transductor. La reacción en la superficie de la micropalanca puede producir dos tipos de respuesta:

- Deflexión del extremo libre de la micropalanca, generado por el cambio de área entre las dos caras de la micropalanca, ya sea por cambio de tensión superficial o de temperatura.

- Cambio de la frecuencia de resonancia de la micropalanca, generada por el cambio de masa y/o cambio de tensión superficial y temperatura.

En consecuencia los biosensores nanomecánicos basan su funcionamiento en la deflexión o cambio de la frecuencia de resonancia inducida en la micropalanca cuando una reacción de reconocimiento biomolecular tiene lugar en su superficie, traduciendo la magnitud de este evento en un movimiento mecánico de unos pocos nanómetros.

La medida de la variación de la frecuencia de resonancia, cuando la detección se realiza en medios líquidos, muestra una baja sensibilidad debido a que la micropalanca sufre serios efectos de amortiguamiento que dificultan la monitorización de esta variación. Dado que la reacción de detección de biomoléculas debe producirse en medio acuoso el cambio en la deflexión de la misma se realiza de forma mucho más sensible por monitorización del cambio en la tensión superficial. Por ello, de aquí en adelante nos referiremos únicamente a este medio de detección para describir el funcionamiento de los biosensores nanomecánicos.

Los cambios en la deflexión de la micropalanca además, pueden evaluarse utilizando un sistema óptico, piezoresistivo, piezoeléctrico, de capacitancia o interferométrico [74] (Figura 17), aunque los más frecuentemente descritos en la literatura son los sistemas de detección ópticos, por su elevada sensibilidad, y los piezorresistivos, por su elevada capacidad de integración. El problema de estos últimos es que para tener una micropalanca piezo-resistiva, ésta normalmente debe tener un elevado grosor, mayor que en los de detección óptica, que reduce su sensibilidad, así como un elevado ruido eléctrico. Estos factores contribuyen a que este método de lectura no logre superar en sensibilidad al de los sistemas ópticos [46, 75].

La lectura óptica del desplazamiento del extremo libre de la micropalanca como consecuencia de la deflexión se puede llevar a cabo mediante un haz láser que incide en dicho extremo y que se refleja en un fotodetector sensible a la posición, que permite calcular el desplazamiento absoluto de la micropalanca [45, 46]. Con este formato se consigue resolución sub-nanométrica y es de fácil implementación, sin embargo es sensible a cambios en la densidad óptica de la muestra y pueden sufrir otros efectos por cambios en las inmediaciones de la micropalanca que provocaría

una señal no relacionada con la interacción. Otra importante desventaja son el alineamiento y calibración previos, que complican el montaje experimental y resultando aún más complejos en formatos de tipo matricial.

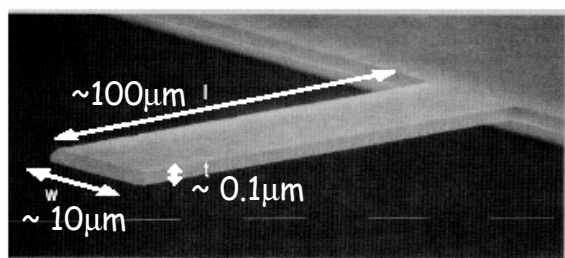


Figura I6. Imagen de una micropalanca típica empleada en biosensores nanomecánicos donde se muestran las dimensiones más comunes.

No es hasta el año 2000, con el trabajo de Fritz y colaboradores cuando se plantearon los biosensores nanomecánicos como una alternativa prometedora para aplicaciones de interés biotecnológico. Este trabajo demostró la habilidad de este tipo de biosensores para discriminar desajustes de una sola base en la secuencia de ADN, así como interacciones antígeno-anticuerpo sin necesidad de usar marcadores [47]. Poco después surgieron otros trabajos de detección de ADN por hibridación [35, 76], detección de proteínas implicadas en el desarrollo del cáncer [77] y otras enfermedades [15, 78], así como en el campo del medioambiente [79], demostrando una buena sensibilidad en la detección.

Este importante desarrollo se ha visto motivado y sostenido a su vez, por el extenso desarrollo de la tecnología microelectrónica actual, lo que permite abordar los costes y la fabricación e integración de estos dispositivos.

Sin embargo la gran parte de trabajos publicados con estos resultados solo demuestran medidas puntuales sin que se haya llevado a cabo un estudio sistemático desde el punto de vista analítico que demuestre su sensibilidad y reproducibilidad y que ponga de manifiesto de forma clara su aplicabilidad. Los resultados inicialmente prometedores no se han logrado materializar en dispositivos concretos ni con aplicaciones reales que permitan su uso fuera del ámbito de la investigación básica de laboratorio. Parte de la problemática que ha dificultado su expansión es el desconocimiento que existe todavía hoy en día acerca de los mecanismos últimos que están detrás de los fenómenos físicos que hacen que las interacciones biológicas entre receptor y ligando

produzcan un cambio significativo de la tensión superficial de la micropalanca. Se han barajado diferentes posibilidades pero por el momento no hay una teoría firme y es un aspecto que genera gran controversia dentro de la comunidad científica [35, 80, 81]. Entre los factores que parecen estar involucrados en la respuesta de tensión superficial, cabe mencionar las interacciones electrostáticas entre moléculas vecinas, cambios en la hidrofobicidad en la superficie de la micropalanca y cambios conformacionales de las moléculas. Por ello los fenómenos de tensión superficial resulten difíciles de correlacionar con el proceso de interacción en sí. Esto es especialmente representativo en el caso particular del ADN, donde los efectos de la hibridación son difíciles de identificar y aislar para maximizarlos y producir un cambio de tensión superficial apreciable. En sistemas de una única micropalanca, en los que no se cuenta con sistemas de referencia, la señal debida a la hibridación puede quedar enmascarada por otros fenómenos tales como ligeras variaciones de pH o temperatura, resultando muy complicada la diferenciación de la señal de una molécula complementaria respecto de una secuencia control [82] que no lo es.

El modelo teórico que permite correlacionar los cambios en la tensión superficial asociados al evento de reconocimiento biomolecular con el cambio en la deflexión de la micropalanca fue propuesto por Stoney a principios del siglo XX [83].

La siguiente ecuación (1) relaciona el radio de curvatura de la micropalanca reflectada con el cambio en la tensión superficial.

$$\frac{1}{R} = \frac{6(1-\nu)}{Et^2} \Delta\sigma \quad (1)$$

Donde R es el radio de curvatura, E y ν son el modulo de Young y el coeficiente de Poisson del material de la micropalanca respectivamente; t es el espesor de la micropalanca y $\Delta\sigma$ es la diferencia de tensión superficial entre ambos lados de la micropalanca.

Al mismo tiempo, la tensión superficial está relacionada con la deflexión total de la micropalanca (z) por la siguiente expresión:

$$z = \frac{3t^2(1-\nu)}{Et^2} \Delta\sigma \quad (2)$$

La tensión superficial está relacionada con el trabajo por unidad de área que se requiere para deformar una superficie elásticamente. Si la variación en la tensión superficial generada por el reconocimiento molecular es positiva, la superficie de la micropalanca tiende a disminuir, doblándose hacia arriba, lo que se denomina estrés tensil. Si por el contrario, tiende a aumentar, la palanca se doblará hacia abajo y se origina un estrés de tipo

compresivo. Ambos tipos se pueden observar en los biosensores nanomecánicos dependiendo del tipo de interacción que tenga lugar en su superficie.

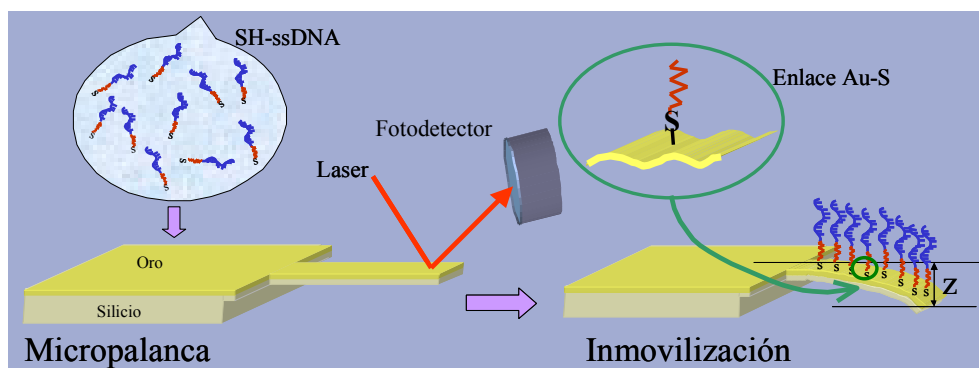


Figura I7. Esquema de un biosensor nanomecánico con sistema óptico de detección. Se muestra la deflexión de la micropalanca como consecuencia de la inmovilización del ADN en su superficie.

Para realizar la medida biosensora debe llevarse a cabo una inmovilización selectiva de las moléculas receptoras sólo en uno de los dos lados de la micropalanca para poder generar tensión superficial. Para ello es necesario el recubrimiento específico sólo de uno de los lados con un material que permita el enlace de la biomolécula en éste sin mostrar afinidad por el otro. El oro resulta un material excelente debido a que es relativamente inerte, al tiempo que permite llevar a cabo una sencilla química de inmovilización mediante el uso de la técnica de monocapas autoensambladas y además favorece la reflexión del haz láser hacia el fotodetector.

3.1.5 BIOSENOSRES DE ADN

En el campo de la medicina, el análisis de genes y polimorfismos en el ADN juegan un papel fundamental en la identificación de mutaciones y desórdenes genéticos de diversa naturaleza que son cruciales para el conocimiento de multitud de enfermedades y permite el desarrollo de estrategias de detección y diagnóstico.

El uso del ADN como receptor, ofrece a los biosensores una oportunidad para situarse como una metodología que permita llevar a cabo este tipo de análisis, gracias a su elevada sensibilidad, capacidad de detección en tiempo real y posibilidad de miniaturización.

Los formatos más sencillos que ofrecen los biosensores son aquellos en los que se mide directamente el evento de hibridación sin emplear

marcajes o reacciones de amplificación. Pero la lectura directa del proceso de hibridación cuando se quieren detectar mutaciones puntuales resulta por ahora muy compleja debido a la baja señal que induce un simple desajuste de la secuencia nucleotídica para el sistema transductor. Por ello en la medida con biosensores se recurre frecuentemente al uso de elementos mediadores o amplificadores que permitan magnificar la diferencia entre una secuencia completamente complementaria de una que no lo sea [84].

Las principales características de los biosensores de ADN más relevantes desarrollados hasta la fecha se resumen en la Tabla I2 y se detallan a continuación:

- **Biosensores de ADN Ópticos:** Los biosensores ópticos son ampliamente usados para la detección de multitud de analitos. Los esquemas de detección más habituales emplean transductores de fibra óptica como sistema de conducción de la luz a la zona de interacción o están basados en la interacción con el campo evanescente, como es el caso del biosensor de Resonancia de Plasmón Superficial.

En los *biosensores de fibra óptica* las secuencias de ADN se inmovilizan sobre ésta y la secuencia diana se marca con una molécula indicadora, generalmente un fluoróforo, de modo que la hibridación genera un cambio óptico (ej. aparición de fluorescencia) que puede ser monitorizado. Con este principio de funcionamiento, Krull y colaboradores [85] desarrollaron un biosensor en el que las secuencias diana se marcaban con bromuro de etidio. El uso de indicadores más potentes (ej. PicoGreen) ha permitido que esta metodología detecte niveles femto-molares de ADN e incluso ha permitido desarrollar sistemas matriciales para la detección de múltiples secuencias [36].

Basados igualmente en fluorescencia son los biosensores denominados *Molecular Beacons*, donde el cambio de conformación que experimenta un oligonucleótido (marcado con una molécula fluorescente y otra que absorbe su fluorescencia, quencher) al hibridar permite la detección [32, 86, 87] (Figura I8).

En los biosensores de *resonancia de plasmón superficial* al detectarse un cambio de índice de refracción que está asociado a un cambio de masa, la detección directa de ADN o de mutaciones, que implican un cambio de masa muy pequeño, resulta muy difícil. Por ahora los límites de detección son relativamente altos, empleando concentraciones de complementario por encima de 1 μM [30, 34, 88-91] aunque se ha descrito un caso de detección entre 10-50nM. En la detección de productos de PCR se ha alcanzado un mejor límite de sensibilidad, entre

150-200 nM [28, 92]. Estos niveles de sensibilidad se pueden mejorar con el uso de marcajes [93-95] o con variantes de la técnica de SPR, como la que propone el grupo de Tamiya y colaboradores en la que se combina la técnica de SPR localizada (L-SPR) con la interferometría, logrando un límite de detección de 10 pM [96].

Basados en campos evanescentes son también los dispositivos interferométricos Mach Zehnder. Aunque son escasas las aplicaciones demostradas con estos dispositivos, en el campo del ADN, nuestro grupo ha demostrado su elevada sensibilidad para su detección e incluso discriminación de mutaciones, logrando un límite de sensibilidad de 10pM [97]

Tabla I2. Ventajas e inconvenientes de diferentes tipos de biosensores de ADN

Tipo	Principio	Ventaja	Desventajas
<i>1. Óptico</i>			
a) Fibra óptica	Basado en ondas de evanescencia, permite la detección de la interacción en la superficie de la fibra óptica	Medida remota in-situ, Alta sensibilidad	Equipo costoso y no portátil
b) Interferometría	Las guías de ondas planas tienen un campo evanescente responsable de cambios en el índice de refracción	Altamente sensible, 0,06 pg/mm ² (Mach Zehnder)	Susceptible de interferencias
c) Resonancia de Plasmón Superficial	Basado en ondas de evanescencia, permite la detección del cambio de índice de refracción asociado a la interacción	Altamente sensible, 0,5-1 pg/mm ² Técnica muy robusta	Equipo costoso
<i>2. Electroquímico</i>			
a. Conductométrico	Cambios en conductancia	Rápido, bajo coste	Disoluciones altamente tamponadas pueden provocar interferencias
b. Potenciométrico	Potencial eléctrico		
c. Amperométrico	Oxidación/Reducción		
<i>3. Piezoelectrico</i>	Oscilaciones de cristales de cuarzo a frecuencia definida, de modo que la unión del analito provoca un cambio de masa que altera la frecuencia de oscilación.	Alta sensibilidad, 10 pg/mm ² rapidez	No tan sensible como biosensores ópticos
<i>4. Nanomecánico</i>	Cambio en la tensión superficial de la micropalanca que origina una deflexión de ésta de unos pocos nanómetros	Multiplexado Alta sensibilidad aunque en ADN sólo es de 75 nM	Uso de micropalanca de referencia. Poco robusta. Principio de funcionamiento poco conocido.
<i>5. Colorimétrico</i>	Aparición de color	No requiere otros instrumentos	No cuantitativo
<i>6. Biochip ADN</i>	Basado en sistemas matriciales	Capacidad de detección de hasta 10 ⁶ secuencias/cm ²	Equipo costoso, largo tiempo de análisis de datos

Dentro de los biosensores ópticos de ADN se destacan asimismo, los que emplean *Quantum dots* o nanopartículas para la detección. Se basan en el fenómeno de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET). Normalmente se lleva a cabo en un formato tipo sándwich, de modo que la transferencia se produce entre un quantum dot unido a un oligo que reconoce la secuencia diana y un fluoróforo que se encuentra unido a la secuencia inmovilizada y que también reconoce la secuencia diana [98]. Con un sistema similar se ha demostrado que acoplando la quimioluminiscencia con una hibridación tipo sandwich, captura de partículas magnéticas y sistemas de flujo, se puede detectar de forma rápida el ADN del virus de la hepatitis B [99]. (Figura I8).

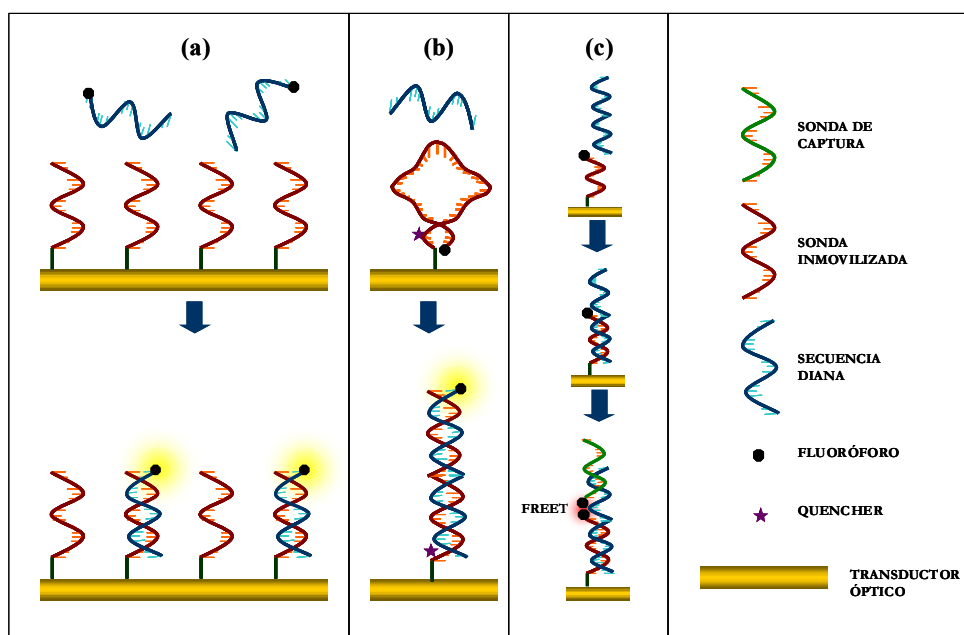


Figura I8. Algunos formatos de detección de biosensores de ADN a) empleando marcapaños fluorescentes b) Molecular Beacons y c) FRET.

- **Biosensores de ADN Electroquímicos:** Los sistemas electroquímicos han demostrado tener una buena capacidad de detección de ADN [100, 101] y es sin duda su capacidad de miniaturización y estandarización, lo que hace de ellos una técnica muy interesante para el análisis de rutina. Requieren en la mayoría de casos del uso de mediadores electroquímicos que reconocen la estructura del duplex para monitorizar la reacción de hibridación.

Uno de los grupos pioneros en la detección de ADN por métodos electroquímicos usando mediadores red-ox es el grupo de Mikkelsen. Ellos demostraron la capacidad de detectar una delección en la secuencia de ADN vinculada con el 70% de casos de fibrosis quística [102] con un límite de detección de 1,8 fmol. El desarrollo constante de este campo proporciona continuamente nuevos indicadores red-ox que permiten generar mayores sensibilidades y especificidad en la discriminación de cadena sencilla y doble [103]. Del mismo modo, cada vez más se está avanzando en nuevas formas de detección más directas, que no requieren del uso de mediadores o marcadores, como la monitorización de cambios en la electroactividad del ADN (ej. medida del pico de oxidación de la guanina/inosina) [104, 105], la monitorización de cambios en la conductividad de polímeros conductores formados por modificaciones del ADN, como los ADN modificados con capas polipirrol [106, 107] o incluso por la monitorización de la velocidad de transferencia de carga al pasar de cadena sencilla a doble, la cual se vería también perturbada por la presencia de una eventual mutación [108].

También en estos dispositivos, se ha hecho uso de nanopartículas para aumentar la sensibilidad de la detección. Con estas nanopartículas se han descrito niveles de detección de unos pocos fmoles [109].

Igualmente reciente es el uso de nanotubos de carbono como una nueva vía de detección. Los nanotubos permiten no sólo desarrollar una química específica de inmovilización de secuencias si no que además actúa como elemento amplificador de la reacción de hibridación al permitir un mejor transporte de carga de la reacción desencadenada por el mediador electroquímico. Además, al presentar una mayor superficie específica permite aumentar de forma notable el número de moléculas de ADN que se pueden emplear [110]. Recientemente el grupo de Fang y colaboradores han descrito niveles de detección 10^{-8} M gracias a la implementación de los nanotubos de carbono de entre 10-30 nm en los electrodos [111].

- **Biosensores de ADN Piezoeléctricos:** Estos biosensores se basan en el cambio de la frecuencia de oscilación de un cristal de cuarzo como consecuencia de la interacción biológica. Este cambio está directamente relacionado con el cambio de masa asociado a la interacción. En la hibridación del ADN, el aumento de masa se traduce en una disminución de la frecuencia de oscilación. Usando estos dispositivos podemos destacar la detección de mutaciones puntuales en el gen p53 [112], implicado en el proceso de control del ciclo celular y la regulación de la apoptosis, o la detección de polimorfismos en la apolipoproteína-E [113]. También se ha

empleado en la detección de organismos genéticamente modificados [114] y microorganismos como *Salmonella typhimurium* [115] o *E. Coli* [116].

- **Biosensores de ADN Nanomecánicos:** basan su funcionamiento en la deflexión o cambio de la frecuencia de resonancia inducida en la micropalanca cuando la reacción de reconocimiento biomolecular tiene lugar en su superficie, traduciendo la magnitud de este evento en un movimiento mecánico de unos pocos nanómetros. En ADN, sólo se ha demostrado su uso empleando la medida del cambio de tensión superficial y su uso es aún muy experimental ya que presenta numerosas limitaciones y dificultades[82]. Empleando sistemas matriciales de ocho micropalancas se ha llegado a detectar la hibridación con un nivel de sensibilidad de 75 nM. Este trabajo es el que mejores límites de sensibilidad presenta, frente a otros que detectan secuencias complementarias del orden micromolar[35]. Presenta la ventaja de permitir la detección de muchas secuencias simultáneamente por lo que es una alternativa prometedora para las aplicaciones en el campo de la genómica[97].

Existen otros sistemas de detección de ADN que, aunque en el sentido estricto de la definición de biosensor no pueden considerarse como tales, ya que no hay un elemento transductor de la reacción de reconocimiento entre el ligando y el receptor, su formato de detección guarda similitudes con éstos y a menudo se engloban dentro de las plataformas biosensoras. Son los biosensores de ADN colorimétricos y los biochips de ADN:

- **Biosensores de ADN Colorimétricos:** Estos biosensores se basan en un cambio de color visualizado en el medio de reacción o a través de una tira reactiva con la ventaja de que no requieren instrumentación adicional para llevar a cabo la detección. Muchos de estos dispositivos emplean nanopartículas de oro ya que las variaciones en su estado de agregación producen cambios físicos que provocan un cambio de color. El estado de agregación varía con la reacción de hibridación, lo que conlleva un cambio en la coloración del medio. Con este sistema se ha alcanzado un límite de detección de 2 fmol de productos de PCR [117].
- **Biochips de ADN:** Representan un nuevo tipo de formato de detección de ADN de tipo matricial que permite la detección de la hibridación por medio de un marcaje fluorescente. Son de gran importancia por su alta capacidad de detección de múltiples muestras dentro de un mismo chip, permitiendo detectar tanto un elevado

número de polimorfismos como variaciones en el grado de expresión de genes. Con estos dispositivos se pueden analizar de forma simultánea hasta 10^6 secuencias/cm². La detección se lleva a cabo de forma rápida y con alta sensibilidad pero es necesario un elevado tiempo de análisis y el empleo de herramientas informáticas específicas y sofisticadas para el análisis de los resultados [84].

En Biosensores de ADN, cabe destacar que los últimos avances en biotecnología han dado pie a nuevas versiones mejoradas de la molécula de ADN con prometedoras aplicaciones en el campo del ADN. Se trata de versiones sintéticas que presentan modificaciones químicas que le confieren propiedades novedosas. Una de estas formas la constituye los PNAs, versiones en las que el enlace ortofosfórico es reemplazado por un enlace de tipo peptídico, de forma que el ADN pierde su intrínseca carga negativa, pero manteniendo la misma capacidad de hibridación que el ADN nativo. Una de las características que lo hacen especialmente atractivo para su uso en genómica es el hecho de que en estas moléculas la presencia de una mutaciones implica un efecto más desestabilizante que en la estructura duplex del ADN, por lo que presenta interesantes características para su uso en biosensores. Con esta molécula se han llevado a cabo ensayo de detección de mutaciones puntuales con biosensores electroquímicos[118, 119], microbalanzas de cuarzo[120], SPR[91] y microarrays[121]

También resulta interesante el uso de dendrímeros de ADN para dotar a los biosensores de mayor sensibilidad. Estas moléculas constituyen superestructuras tridimensionales con numerosos brazos de ADN de cadena sencilla susceptibles de participar en la hibridación[122].

3.2 Inmovilización de biomoléculas sobre superficies biosensoras en oro

El proceso de inmovilización de biorreceptores en la superficie de un dispositivo biosensor es uno de los procesos más importantes para su correcto funcionamiento y condiciona tanto su aplicabilidad como la sensibilidad y reproducibilidad del mismo.

La forma en que se lleve a cabo este proceso va a influir en aspectos tan críticos como la accesibilidad del ligando a la superficie, el grado de interacciones inespecíficas de éste con la superficie, la reactividad cruzada con otras especies presentes, así como la capacidad de regeneración de la capa receptora. Además dicho proceso debe llevarse a cabo de manera selectiva hacia el analito de interés pero de forma que no se alteren las propiedades del transductor y que se genere la mayor señal posible. Es un proceso que depende de forma directa del tipo de material con que esté fabricado el transductor y de los grupos funcionales reactivos presentes en la

biomolécula, a través de los cuales se puede llevar a cabo la reacción química de inmovilización.

En los últimos años se han desarrollado múltiples técnicas de inmovilización orientadas a conseguir monocapas autoensambladas que mejoren la eficiencia de la reacción de reconocimiento. Estos procedimientos dependerán de la aplicación final y del soporte utilizado.

El tipo de soporte condiciona el tipo de modificación química que se puede emplear para inmovilizar la molécula. En biosensores las superficies más comunes son las de metales, como el oro, y las de silicio, como óxido de silicio o nitruro de silicio.

Las biomoléculas pueden ser inmovilizadas en la superficie o pueden ser atrapadas o inmovilizadas en una matriz tridimensional. El uso de matrices tridimensionales permite i) disponer de un número mayor de sitios de adsorción para el receptor; ii) mejorar la accesibilidad de la molécula diana ya que en la inmovilización en superficie, para disponer de un elevado número de receptores se requiere un alto empaquetamiento lo que implica mayores problemas estéricos; y iii) generar un entorno más favorable para la conservación de los receptores inmovilizados cuando las superficies requieren una alta estabilidad con el tiempo. La matriz más ampliamente usada para este fin es el dextrano carboximetilado [57]. También se han empleado nanopartículas de oro permitiendo obtener una mayor superficie específica y una mayor eficiencia de hibridación [123].

Los métodos de inmovilización comprenden i) métodos físicos, fundamentalmente por adsorción o por atrapamiento si la superficie es de tipo poroso y ii) métodos químicos, ya sea por unión covalente o por entrecruzamiento.

Los métodos que se pueden emplear para la inmovilización del ADN son muy diversos. La adsorción física es el método más sencillo de inmovilización [124] debido a que no necesita ninguna instrumentalización, reactivos o utilización de ADN funcionalizado. Consiste simplemente en poner en contacto la solución de ADN con un material adsorbente durante el tiempo suficiente para que se produzcan interacciones de tipo no covalente, como fuerzas electrostáticas, hidrofóbicas, puentes de hidrógeno o de Van der Waals. Los métodos de inmovilización no covalente, principalmente basados en la adsorción física del ADN, utilizan la carga global negativa en solución, que lo hace idóneo para su adsorción en soportes de carga positiva. Aunque es un método sencillo y rápido este tipo de inmovilizaciones generan adsorción no orientada y las moléculas de ADN se encuentran en su mayoría tumbadas en la superficie. También existe la posibilidad de deserción por lo que las eficiencias de hibridación son pobres debido a que la unión se realiza por múltiples sitios de la cadena de ADN lo que desfavorece el apareamiento de bases complementarias.

El atrapamiento dentro de una matriz porosa se puede realizar de tres maneras diferentes [124]: i) por inclusión dentro de una matriz de polímero disolviendo la molécula de ADN en una disolución del polímero y dejando secar el disolvente; ii) por inclusión en la propia matriz del transductor, como es el caso de los biosensores electroquímicos iii) por encapsulamiento de la molécula dentro de una membrana semipermeable.

Los métodos de inmovilización covalente permiten orientar y posicionar de manera ordenada y controlada las moléculas de ADN. En este caso se lleva a cabo su fijación por enlace covalente al soporte a través de uno de sus extremos, de forma que las moléculas se encuentran en gran medida en posición vertical, favoreciendo la accesibilidad y la hibridación con su secuencia diana. Estos métodos son los más apropiados para el desarrollo de biosensores de ADN.

Tanto en biosensores de resonancia de plasmón superficial como en biosensores nanomecánicos la superficie del transductor consiste en una capa de oro de espesor nanométrico, por lo que la química de inmovilización del ADN debe desarrollarse de forma específica para este tipo de superficies.

La forma ideal de inmovilización sobre esta superficie es mediante un único punto de unión de la molécula de ADN a través del extremo 3' o 5'. Este tipo de inmovilización controlada dará lugar a una orientación adecuada facilitando la accesibilidad a la molécula diana. Se obtendría así una mayor eficiencia en la reacción de hibridación, a diferencia de la inmovilización en sitios múltiples que conlleva una cinética de reacción más lenta, compleja e impedida.

El método más comúnmente empleado para inmovilizar moléculas en superficies de oro se basa en la formación de monocapas autoensambladas (Self-Assembled Monolayers, SAMs).

Las SAMs pueden definirse como ensamblajes moleculares ordenados que tienen lugar de forma espontánea, por la adsorción de un surfactante con afinidad específica por el sustrato [125]. Están constituidas por un grupo funcional enlazante que interacciona de forma específica con la superficie, una cadena o esqueleto espaciador y un grupo terminal que determina las propiedades físicas y químicas de la monocapa. Durante el proceso de ensamblaje diversas fuerzas e interacciones son responsables de la cinética del crecimiento y la estructura final de la monocapa [125, 126]. El proceso de quimiadsorción se produce por enlace covalente del grupo funcional enlazante con el sustrato al tiempo que otras interacciones de carácter más débil, como las interacciones entre cadenas laterales y entre las cadenas y el sustrato, contribuyen también a las propiedades de la estructura final de la monocapa.

La inmovilización del ADN a través de SAMs puede llevarse a cabo de dos formas:

i) *Directa*: funcionalizando el ADN con un grupo enlazante con afinidad para unirse de forma covalente al sustrato, de manera que el ADN se auto-ensamble directamente sobre la superficie (Figura I9). Este método de inmovilización constituye la forma más sencilla de anclar el ADN. En superficies de oro se lleva a cabo modificando el ADN con un grupo enlazante mercapto, dada la gran afinidad del azufre por el oro [127]. El ADN puede funcionalizarse con diferentes forma de grupos mercapto, ya sea en la forma oxidada (disulfido: -S-S-) o reducida (sulfidriilo: -SH). La unión del grupo mercapto a la cadena de ADN se realiza durante su proceso de síntesis por el método de la fosforoamidita y puede incluirse tanto en el extremo 5' como 3'. De las dos posiciones la más frecuentemente utilizada es la 5'. Se ha demostrado que ambas posiciones no son equivalentes en el tipo de monocapa generada presentando importantes diferencias en sus propiedades finales [128].

Comercialmente pueden adquirirse las siguientes formas de grupos mercapto: i) un grupo SH en 5' o 3': 5' HS-(CH₂)₆-Oligo o 3' HS-(CH₂)₃-Oligo , ii) un grupo disulfido que puede presentar a su vez un grupo protector dimetoxitrityl (DMTO) acoplado al puente disulfuro: DMTO-S-S-(CH₂)₆-Oligo o iii) con el puente disulfuro acoplado a dos cadenas de oligo, que constituye la forma dimérica del oligo con funcionalización SH- : Oligo-(CH₂)₆-S-S-(CH₂)₆-Oligo.

El anclaje covalente por vía directa es sencillo, directo y rápido por lo que los procesos de inmovilización en oro a través de esta derivatización química han sido ampliamente utilizados y caracterizados [129-133]. El ADN así inmovilizado puede alcanzar una excelente eficiencia de recubrimiento generando monocapas altamente empaquetadas.

Los empaquetamientos elevados permiten minimizar los procesos de adsorción física de las moléculas de ADN con la superficie a través de las bases nitrogenadas pero pueden suponer un problema para la accesibilidad de su molécula complementaria (Figura I10). Se ha comprobado que el recubrimiento obtenido y el grado de minimización de las interacciones inespecíficas afectan de forma importante a la velocidad y la eficiencia de hibridación, aspectos que pueden controlarse mediante el uso de tampones apropiados y según la concentración de ADN [129].

El control de los procesos de fisiadsorción es de vital importancia en los procesos de inmovilización. El ADN fisiadsorbido suele disponerse en posición horizontal, tumbado sobre la superficie de oro y estableciendo puntos de unión con ésta a través de un cierto número de bases nitrogenadas. Esta configuración inhabilita a la molécula para la hibridación disminuyendo la eficiencia del biosensor.

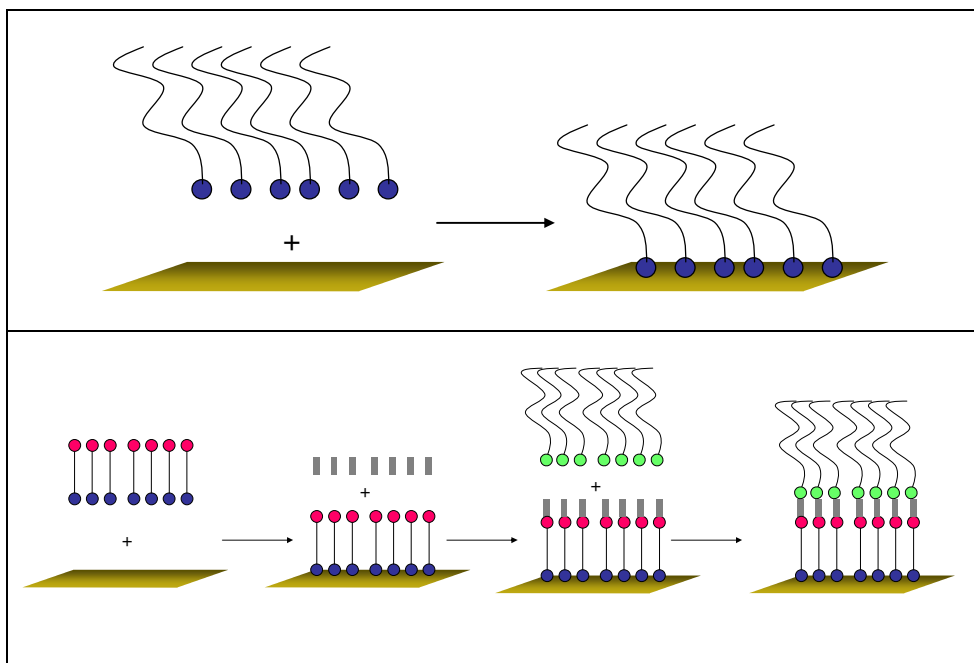


Figura I9. Esquema de las formas de inmovilización de ADN a través de SAMs por inmovilización directa de ADN funcionalizado (arriba) e indirecta (abajo).

Una manera eficaz de controlar la fisisorción es empleando moléculas que actúen por un lado de espaciadoras entre moléculas adyacentes controlando el grado de recubrimiento y por otro, rellenando las posiciones vacantes del oro, impidiendo que las cadenas de ADN no específicas entren en contacto con la superficie (Figura I10).

El uso de espaciadores en monocapas de ADN fue estudiado en profundidad por primera vez por el grupo de Tarlov y colaboradores [129]. Este grupo empleó una pequeña molécula de seis átomos de carbono llamada mercaptohexanol (MCH) portadora en un extremo de un grupo $-SH$ para unirse al oro y en el contrario, de un grupo $-OH$ que previene la fisisorción del ADN al oro. Con el uso del MCH, este grupo encontró que la fisisorción se reducía de forma considerable y el ADN quimiadsorbido pasaba de una conformación principalmente tumbada, a una configuración más vertical, con las cadenas levantadas y con un único punto de anclaje al oro, a través del grupo azufre, al tiempo que la hibridación era mucho más eficiente con cerca del 100% de cadenas hibridadas. Estas cadenas, sin embargo, en lugar de permanecer perpendiculares a la superficie adoptan una cierta inclinación con respecto a la vertical [130].

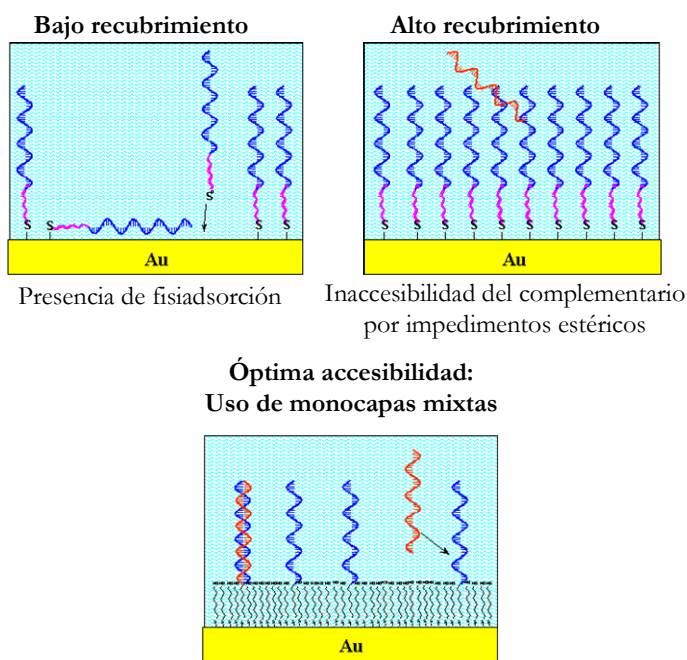


Figura I10. Esquema de la accesibilidad de la molécula complementaria en función del grado de empaquetamiento de la monocapa de ADN inmovilizada

A partir de este concepto muchas otras estrategias han surgido para ejercer un control preciso sobre la densidad de la monocapa de ADN y con el fin de maximizar la eficiencia de la hibridación. Entre ellas está la de usar espaciadores de mayor longitud al MCH [134, 135], el uso de espaciadores verticales que separen la secuencia de hibridación de la superficie [136], la inmovilización del ADN en forma duplex e incluso el uso de ADN con regiones mixtas de cadena sencilla y doble [137].

Otro aspecto que influye en la densidad del recubrimiento y en la eficiencia de hibridación es la longitud de la cadena de ADN inmovilizada. Se ha constatado que por debajo de 24 bases, los oligos de ADN se encuentran dentro de la monocapa en una configuración estirada, en forma de bastón, siendo el recubrimiento independiente de la longitud de la cadena. Sin embargo por encima de 24 bases, las cadenas están en parte replegadas sobre sí mismas y ocupan un volumen mayor lo que implica un mayor desorden de la monocapa y un menor recubrimiento [132].

ii) *Indirecta*: Modificando la superficie con una monocapa autoensamblada que porte en el extremo opuesto al grupo enlazante, un grupo funcional reactivo a través del cual se pueda realizar una química específica para su unión a la molécula de ADN (Figura I8). Este método es más laborioso que

la inmovilización directa pero suele presentar menos problemas de accesibilidad.

En esta forma de inmovilización se suele emplear un alcanotiol con un grupo mercapto para unirse a la superficie y un grupo funcional en el extremo opuesto, generalmente amino o carboxilo por el cuál se une el ADN previamente modificado, generalmente con un grupo amino [138]. Esta química se usa muy a menudo para unir proteínas a través del grupo amino o carboxilo, pero para el ADN es mucho más infrecuente, dado que resulta más sencillo hacerlo por vía directa. También se han descrito otras variantes como la inmovilización de ADN funcionalizado con un grupo mercapto sobre superficies de oro previamente derivatizadas con monocapas de polietilenglicol [139] o mediante el uso de dendrímeros [122].

Otra alternativa muy extendida consiste en hacer uso de la interacción entre las proteínas de biotina y avidina o estreptavidina para inmovilizar las secuencias de ADN [88]. En este caso el ADN se modifica con una molécula de biotina y se lleva a cabo una inmovilización previa de la molécula de avidina sobre la superficie de oro, de manera que se permita su inmovilización mediante la unión específica avidina-biotina. La mayor desventaja de este método es que aumenta de forma notable el tiempo de experimentación, ya que la inmovilización previa de la avidina implica numerosos pasos de reacción química.

3.3 Detección precoz de cáncer de mama hereditario.

3.3.1 IMPORTANCIA DE LA GENÉTICA EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER

El cáncer es una enfermedad largamente conocida y casi tan antigua como la historia del hombre [140]. Encontramos evidencias de su existencia en numerosos rastros fósiles desde la era prehistórica y en otros tantos restos arqueológicos, como es el caso de la iconografía egipcia encontrada en algunas tumbas o la primera mención de un tratamiento quirúrgico de un tumor encontrado en el papiro de Edwin Smith procedente de Egipto (alrededor de 1.600 A.C.).

En la actualidad el cáncer sigue siendo una enfermedad de gran impacto en la vida del ser humano suponiendo una de las primeras causas de mortalidad, por encima de las enfermedades cardíacas, en personas de menos de 85 años de edad. Por ello, el conocimiento acerca del cáncer en cuanto a la aparición, desarrollo y evolución de los procesos tumorales constituye uno de los más claros e importantes objetivos de la investigación actual a nivel mundial. Su estudio abarca áreas muy diferentes, desde la biofísica y biología más fundamental hasta la más aplicada, pasando por el desarrollo de novedosas técnicas y análisis para su detección en etapas cada vez más

tempranas, así como el desarrollo de procedimientos médicos para mejorar su diagnóstico y tratamiento.

En las células normales el crecimiento y la división están estrictamente regulados, es decir, tienen programada la duración de su vida: es la llamada apoptosis o muerte celular programada. Las células cancerosas son una excepción a este control debido a que han sufrido cambios fundamentales que anulan estos mecanismos de control y les permiten escapar de ellos [141-143]. Las células cancerosas evolucionan manifestando *cambios en su grado de proliferación*, multiplicándose indefinidamente y perdiendo el control del crecimiento típico de una célula normal, así como *cambios en su comportamiento y morfología*, es decir, pierden su adhesividad al sustrato y se hacen independientes del anclaje, aumentan su movilidad, pierden la inhibición por contacto y tienen un crecimiento multidireccional desordenado desde un foco. La célula cancerígena adquiere la *propiedad de desplazarse* desde el tejido de origen y establecer una colonia en otro lugar del organismo lo que da lugar a la aparición de metástasis [144].

El cáncer podría definirse como *la enfermedad o conjunto de enfermedades de las células, que han cambiado el mecanismo de control que gobierna su proliferación y diferenciación [144-146], presentando un origen monoclonal, es decir, procedente de una sola célula, de modo que la división de ésta en las dos células hijas, genera dos células hijas, ambas también cancerosas.*

Las alteraciones que sufre una célula para degenerar en un tumor maligno, son de tipo genético, daños irreversibles a nivel del ADN celular que provocan pérdida de los mecanismos que controlan la muerte y nacimiento celular, lo que conlleva a una superpoblación de células que se eternizan, y que constituyen el tumor en sí. Por esta razón, se puede afirmar que todos los cánceres son genéticos en origen ya que proceden de alteraciones en el ADN, denominadas mutaciones, ocurridas en una célula somática. Pero en general son sucesos de tipo esporádico restringidos a un tipo de tejido en particular.

Los cánceres esporádicos se generan por una acumulación de eventos genéticos que provocan el crecimiento descontrolado de un clon celular. Estas alteraciones genéticas implican sobre todo a genes relacionados con la proliferación y se producen a nivel de las células somáticas por tanto no es hereditario. Pero existe una baja proporción de casos de cáncer, estimada en torno al 5%-10%, donde aparece una predisposición hereditaria a su desarrollo [147, 148]. En estos casos existe una alteración mutacional que aparece a nivel de uno o varios genes y que se hereda de forma mendeliana confiriendo a la descendencia un mayor riesgo de padecer la enfermedad.

3.3.1.1 Susceptibilidad genética y cáncer

En los cánceres en los que existe una cierta predisposición genética hay una alteración en el ADN que está presente en todas las células del cuerpo, incluidas las germinales, de modo que puede ser transmitida a la siguiente generación, y con ello, el riesgo asociado al desarrollo del tipo de cáncer con que está vinculada.

La predisposición genética, también denominada *susceptibilidad genética*, se podría definir como *la cualidad de ser más vulnerable de lo normal a una enfermedad o trastorno, atribuyéndose esta vulnerabilidad a la alteración genética (mutación) de uno o varios genes*. El conocimiento de la susceptibilidad genética individual o de un grupo poblacional concreto es un dato muy importante para la prevención y vigilancia de los mismos pudiendo establecerse estrategias adecuadas para su prevención, diagnóstico y/o curación.

En el cáncer la susceptibilidad se manifiesta en distintos individuos de un grupo familiar a través de las generaciones, con un patrón compatible con una segregación mendeliana, donde las alteraciones genéticas que confieren esta predisposición son casi siempre de carácter recesivo, manteniéndose el funcionamiento correcto mientras persista una copia normal del gen afectado [149].

El cáncer hereditario suele aparecer a una edad más temprana que el esporádico, por debajo de los 40-45 años, y el riesgo de desarrollarlo está relacionado con el grado de parentesco[150]. En los individuos predispuestos es frecuente la presencia de tumores de localización multifocal, de modo que el cáncer puede aparecer sincrónicamente en varios puntos del mismo órgano, así como la asociación de múltiples neoplasias. También es frecuente el desarrollo bilateral de la enfermedad en órganos dobles como es el caso de la mama diagnosticándose en las dos mamas sincrónica o metacrónicamente. Las neoplasias que afectan a los miembros de la familia suelen ser de un tipo concreto, pero también pueden encontrarse otros tumores o incluso una agrupación de distintos neoplasias en una misma familia. Por otra parte la incidencia elevada de casos de cáncer en una familia no implica necesariamente una base genética, sino que pueden existir factores ambientales que afecten a dicha familia en concreto.

La existencia de un cáncer hereditario se demuestra objetivamente identificando la mutación en la línea germinal en un gen concreto. Una mutación es una alteración permanente en la secuencia del ADN genómico que consiste generalmente en el cambio sólo de una o varias bases por otra/s de la cadena de ADN. Este cambio de la secuencia de base/s del ADN provoca un cambio de la secuencia de aminoácidos de la proteína que se va a sintetizar que afecta de forma negativa a su funcionamiento, aumentándolo, disminuyéndolo o anulándolo e induciendo la enfermedad en las células donde actúe esta proteína.

En los últimos años se han identificado una serie de alteraciones genéticas o mutaciones, que pueden ser transmitidas de padres a hijos/as y que aumentan notablemente el riesgo de desarrollar diferentes tipos de cáncer entre los miembros de una misma familia. El conocimiento y uso de esta información es crucial para el tratamiento precoz y preventivo. Sin embargo los conocimientos de susceptibilidad genética deben protegerse y utilizarse cuidadosamente ya que desde el punto de vista de la bioética pueden significar una nueva forma de discriminación social y laboral lo que puede acrecentar las desigualdades sociales o de género [151].

3.3.1.2 Tipos de mutaciones involucradas en cáncer

Las mutaciones asociadas con el cáncer (ver cuadro I1), ya sean somáticas o de línea germinal, mutaciones puntuales o supresiones grandes, alteran a proteínas clave en sus funciones dentro del organismo. Una gran variedad de mutaciones parecen estar involucradas en la fenomenología del cáncer. No sólo son críticas las mutaciones en las regiones codificantes del ADN, sino que las mutaciones en regiones no codificantes, como por ejemplo en regiones promotoras, en sitios de corte y empalme (splicing), regiones amplificadoras o reguladoras negativas de un gen, pueden resultar en subexpresión o sobre-expresión de proteínas necesarias para la correcta funcionalidad de un determinado proceso fisiológico. Otras mutaciones pueden afectar a la producción de proteínas fundamentales para el control de mecanismos tan importantes como los que regulan los procesos de división y proliferación o la adhesión celular. Colectivamente estas mutaciones son claves para cambiar un genoma de normal a canceroso.

Algunas de las mutaciones se establecen de forma característica en un cierto porcentaje de la población, constituyendo variantes genéticas que ocurren de forma frecuente, comúnmente denominados polimorfismos de un solo nucleótido (single nucleotide polymorphisms o SNPs, en inglés). Hay más de un millón de polimorfismos de único nucleótido en el genoma humano. Estas mutaciones deben ocurrir en una proporción significativa, más de un 1%, de una población amplia para ser considerado como un SNP.

Se han identificado tres grupos de genes que pueden estar mutados en el cáncer [152, 153] :

1. *Protooncogén*. Los productos de estos genes están normalmente relacionados con varios aspectos de la división celular. Su mutación y transformación en oncogén se traduce en un aumento de función, perjudicial en la regulación del crecimiento celular. Como consecuencia el alelo mutante confiere un potencial oncogénico al provocar la síntesis de una proteína que estimula la división celular. Las versiones mutantes son excesiva o inapropiadamente activas y es suficiente la mutación en un alelo para que se

produzca la alteración de la función celular y en consecuencia, la transformación neoplásica.

2. *Gen supresor tumoral*. Codifica productos que ejercen un control negativo en la división y crecimiento celular o están implicados en la muerte celular programada. La actividad oncogénica requiere la mutación o alteración de ambos alelos. Si en un alelo se produce la mutación germinal, para que ocurra su inactivación es necesario que en el otro alelo se produzca la mutación somática, adquirida a lo largo de la vida. Cuando esto ocurre se produce una pérdida completa de función y presumiblemente un crecimiento celular no regulado.

3. *Genes reparadores de ADN*. Normalmente funcionan en el reconocimiento del daño y reparación del ADN. Son responsables de mantener la integridad del genoma y la fidelidad de la información que transfieren. Su mutación requiere la pérdida de la función de los dos alelos y una vez que ocurre provoca la acumulación de errores en el ADN de la célula. Los errores se producen al azar y cuando afectan a oncogenes o genes supresores de tumores se puede desarrollar el cáncer.

El grado de participación de cada uno de los genes implicados en la susceptibilidad al desarrollo final del cáncer, lo que se denomina *grado de penetrancia*, es un factor muy útil para seleccionar los genes más representativos y utilizarlos como dianas en las pruebas de detección precoz y en la búsqueda de mutaciones o alteraciones en los niveles de expresión de los mismos. La penetrancia también puede definirse como la probabilidad de que el efecto de una mutación llegue a ser clínicamente aparente.

La mayoría de los cánceres familiares se transmiten con carácter autosómico dominante y con diferentes grados de penetrancia. En el patrón de herencia mendeliana autosómica dominante, a partir de uno de los padres afectados, pueden existir tres posibles genotipos: portador de dos copias (alelos) del gen no mutados (homocigoto normal), portador de una copia del gen mutado y la otra normal (heterocigoto para la mutación) o portador de los dos alelos del gen mutados (homocigoto para la mutación).

En los dos últimos casos se trataría de individuos afectados por la enfermedad o con riesgo de estarlo según la penetrancia del gen, aunque resulta extremadamente raro que un individuo sea portador de las dos copias de un gen autosómico dominante relacionado con una enfermedad, en parte por el potencial letal de un feto homocigoto afectado.

Los cánceres en los que se ha demostrado la existencia de cierta predisposición genética son el cáncer colorrectal, el cáncer de mama y el cáncer de ovario. En este trabajo de Tesis centraremos nuestra atención en el cáncer de mama heredado cuya genética se detalla a continuación.

Cuadro I1. Tipos de mutaciones asociadas con el cáncer.

(<http://www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/espanol/genomica/allpages>)

Los siguientes tipos de mutaciones se encuentran frecuentemente asociadas con el cáncer, ya sea en su aparición, desarrollo o progresión de su malignidad:

Mutaciones de Novo: Es una nueva mutación que ocurre de forma espontánea en una célula germinal y entonces se transfiere a uno de la progenie. Todas las mutaciones de línea germinal empezaron como una mutación de novo en algún ancestro. Las mutaciones de novo son comunes en unos cuantos síndromes de susceptibilidad al cáncer heredado.

Mutaciones puntuales: Son cambios individuales, generalmente de tipo somático, en alguna de las bases de la secuencia del ADN. Son el tipo más común de alteración en el ADN. Pueden ocurrir por *sustitución de bases* al cambiar la posición de un nucleótido por otro; por *pérdida de nucleótidos o delección*, o bien, por *inserción de nuevos nucleótidos*, incluso, pueden darse giros de 180 grados donde dos segmentos de nucleótidos de hebras complementarias se invierten y se intercambian, lo que se conoce por *mutaciones por inversión*.

Según la región del ADN en la que tengan lugar, podemos distinguir varios tipos:

- En regiones codificantes del ADN:
 - a) *Mutaciones de un aminoácido:* Pueden tener efectos variables en la proteína resultante dependiendo del aminoácido específico que es cambiado y la secuencia de proteína que resulta. Si la mutación se produce por sustitución de un nucleótido por otro, pero el triplete resultante es equivalente y codifica para el mismo aminoácido, o uno de propiedades químicas similares, se producirá una *mutación silenciosa*, generándose una proteína normal y funcional. Si por el contrario, la mutación conduce a la generación de un triplete que codifica para un aminoácido distinto y de propiedades químicas diferentes, *mutación de cambio de sentido*, puede producirse una proteína anómala, sobretodo, si el cambio es crítico al sitio catalítico de la proteína o a su plegamiento y estructura tridimensional. También puede generarse una *mutación terminadora*, si el triplete transcrito codifica para uno de tres codones de detención, lo cual resulta en la terminación prematura de la proteína. Las mutaciones terminadoras pueden ser causadas por sustituciones de pares de bases individuales o por mutaciones de cambio en marco de lectura.
 - b) *Mutaciones en el marco de lectura:* Ocurren por una delección o una inserción en la secuencia de inicio de codificación de una proteína. Dado que la maquinaria de síntesis proteica lee los nucleótidos de 3 en 3, la falta o el agregado de una base resultará en un cambio de todo el mensaje posterior, ya que altera el contenido de cada codón triplete que sigue en un marco de lectura. Las mutaciones de cambio en el marco de lectura por lo general resultan en una proteína anormal acortada (si aparece un codón de terminación) o no funcional.
- En regiones no codificantes del ADN:
 - a) *Mutaciones en los sitios de empalme:* El empalme es controlado por secuencias específicas de intrones, conocidas como secuencias de empalme-donador y empalme-aceptador, las cuales están al costado de los exones. Las mutaciones en estas secuencias pueden conducir a la retención de segmentos grandes de ADN intrónico por el ARNm, o a exones completos que están siendo empalmados fuera del ARNm. Estos cambios podrían resultar en la producción de una proteína no funcional.
 - b) *Mutaciones reguladoras:* Son mutaciones que tienen lugar en regiones no codificantes, generalmente situadas en las regiones 5' o 3' de los genes y que regulan, activando o reprimiendo, la tasa de producción de proteínas.

Grandes supresiones o inserciones en un cromosoma. Puede ocurrir durante la mitosis o la recombinación en la meiosis por translocación o inversión de segmentos de un cromosoma. Las translocaciones ocurren cuando estos segmentos se desprenden y se fusionan a un cromosoma diferente, sin pérdida alguna de material genético. Las inversiones son mutaciones que se originan cuando dos rupturas ocurren en un cromosoma y la pieza se reinserta en orden inverso. Otras anomalías cromosomales incluyen la no disyunción, el fracaso de los homólogos (pares de cromosomas) para separarse a medida que las nuevas células se dividen.

3.3.2 GENÉTICA DEL CÁNCER DE MAMA HEREDADO

Cerca del 10% de la totalidad de casos de cáncer de mama son debidos a mutaciones reconocidas en la línea germinal (cáncer hereditario). No obstante en torno al 15-20% de las personas afectadas por cáncer de mama tendrán uno o más parientes de primer o segundo grado afectados también por cáncer de mama, por lo que combinando ambos porcentajes se obtiene que el riesgo de cáncer de mama familiar abarca el 20-25% del total de casos de cáncer de mama. Esta cifra podría estar, sin embargo, infra-estimada por la limitada información de historiales familiares a la hora del diagnóstico de cáncer [154].

El cáncer de mama familiar se asocia a su vez a un extenso conjunto de síndromes cancerosos, de los cuales el de ovario es el más frecuente, lo que hace que el riesgo de tener cáncer de mama familiar predisponga al individuo a padecer otros tipos de cáncer y viceversa [155].

El CM hereditario se caracteriza por una aparición a edades tempranas (del orden de 5 a 15 años antes que los casos esporádicos), bilateralidad, transmisión vertical a través de la línea materna o paterna y asociación familiar con tumores de otros órganos, particularmente ovario y próstata [156]. Asimismo muestra una gran influencia hormonal. Muchos de los factores de riesgo establecidos -menarquia temprana, menopausia tardía, nuliparidad, edad tardía del primer parto y obesidad en mujeres posmenopáusicas- suponen una mayor exposición de la glándula mamaria a los estrógenos circulantes. También se han descritos otros factores de riesgo externos de tipo ambiental así como la presencia de antecedentes familiares de esta enfermedad, que en comparación con los factores ambientales confieren un mayor riesgo de CM para aquellas mujeres cuyos parientes se encuentran afectados por la enfermedad.

Por ello recientemente se ha introducido en los programas de detección precoz los estudios de análisis genéticos en pacientes con antecedentes familiares de CM, con el fin de establecer el riesgo del paciente a desarrollarlo. Como consecuencia se creó en 1997 la red europea de calidad genética molecular *The EMGQN*, del inglés *The European Molecular Genetics Quality Network* [157], como una organización independiente para establecer un control y unos criterios de calidad en los métodos de detección de las mutaciones estudiadas en los análisis genéticos. Esta organización también se encarga de establecer los niveles de sensibilidad y especificidad en los procedimientos empleados en los test de genética molecular.

3.3.2.1 Implicación de los genes BRCA1 y BRCA2

En el estudio del CM heredado se ha demostrado la participación de todo un conjunto de genes que presentan una penetrancia que puede variar dentro de un intervalo amplio. No obstante un pequeño porcentaje de estos casos son atribuibles a mutaciones heredadas en los genes BRCA1 y BRCA2 que sí presentan una alta penetrancia en el grado de susceptibilidad al mismo. En el resto de los casos la susceptibilidad al CM viene dada por un conjunto de múltiples genes de baja penetrancia por lo que cada caso se debería estudiar de forma personalizada dentro del árbol genealógico de la familia [158-162, 163].

La alta penetrancia de los genes BRCA1 y BRCA2 permite la realización de un diagnóstico precoz para un cierto grupo de mujeres, aunque dicho estudio debería completarse con un análisis más exhaustivo del grado de penetrancia de otros genes en el árbol familiar así como el estudio de factores de riesgo externos.

El BRCA1 es un gen supresor tumoral regulador transcripcional localizado en el cromosoma 17q12-q21. Fue el primer gen aislado que demostraba la existencia de una susceptibilidad al CM [158], aunque ya existían estudios epidemiológicos previos que indicaban la influencia de ciertos factores genéticos hereditarios en el desarrollo de la enfermedad [164].

Se ha observado que las mutaciones en este gen aparecen en toda su longitud. Se han identificado gran número de mutaciones en diferentes alelos de BRCA1, la mayor parte de las cuales (86%) da como resultado una terminación prematura de la proteína BRCA1. Se ha demostrado que la mutación en BRCA1 es responsable del 45 % de los cánceres de mama hereditarios. Las personas portadoras de una mutación en este gen tienen un 80-90% de riesgo de presentar CM antes de los 45 años y un 50% de presentar cáncer de ovario [162].

El 80 % de las familias en los que hay casos múltiples de cáncer mamario y ovárico tienen mutaciones del gen BRCA1. Las mutaciones del gen BRCA1 no parecen incrementar el riesgo de cáncer mamario en varones, aunque estos cuando son portadores de mutaciones de BRCA1 pueden transmitir el alelo de alto riesgo a sus descendientes.

El gen BRCA2 por su parte se encuentra localizado en el cromosoma 13q12-q13 [165, 166]. También está asociado con CM y de ovario, y a diferencia del BRCA1 se relaciona además con casos de CM en varones. Es también un gen supresor tumoral y la presencia de mutaciones en el mismo conlleva que el riesgo de presentar CM (generalmente antes de los 50 años) sea mayor del 85%, el de presentar cáncer de ovario del 10-20% y el de CM en varón del 5-10% [162]. El gen BRCA2 es responsable del 35% de los cánceres de mama hereditarios y se relaciona con el 70% de las familias con cáncer no vinculadas al BRCA1.

De las familias que tienen CM heredado en el 52% de los casos es debido al gen BRCA1, en el 32% al BRCA2 y el 16% restante no se atribuye a ninguno de estos genes [162, 163, 167].

La incidencia de determinadas mutaciones en familias de alto-riesgo por su historial familiar varía de forma notable en las diferentes poblaciones aunque se han encontrado grupos étnicos con una mayor prevalencia de alteraciones en estos genes [156, 167]. Hay poblaciones o regiones que presentan un amplio espectro de mutaciones diferentes mientras que otros muestran únicamente un reducido grupo de ellas de forma específica debido a un efecto denominado *fundador*. Los fundadores son pequeños grupos poblacionales o étnicos que han permanecido aislados de forma que mantienen un cierto carácter endogámico que hace que una determinada mutación se mantenga y se haga común dentro del mismo [168, 169].

El ejemplo más representativo y conocido de presencia de mutaciones fundadoras vinculadas al cáncer de mama hereditario lo constituye la población de judíos Ashkenazi, término que engloba a los judíos que poseen ancestros de países de Europa central y del este, como Alemania, Polonia, Lituania, Ucrania y Rusia. Se han descrito otros casos de mutaciones recurrentes en otros países del mundo [170-175]. .

La presencia de estas mutaciones fundadoras implica que por ejemplo en los judíos Ashkenazi las tres mutaciones fundadoras (dos en BRCA1 (185delAG y 5382insC), y una en BRCA2 (6174delT)) estén presentes en una proporción del 2,6% (1/40) comparado con la frecuencia del 0,2% (1/500) que se da en la población general [176-179].

En estos grupos donde la existencia de estas mutaciones fundadoras es tan relevante, su identificación es extremadamente importante con el fin de conocer de forma precisa el riesgo asociado por su pertenencia a dicho grupo poblacional y de elegir la estrategia y/o aproximación genético-molecular más adecuada.

Es preciso destacar que salvo casos concretos como los que acabamos de mencionar no existen mutaciones con una prevalencia muy superior al resto.

Dado que el BRCA-1 es un gen en el cuál se ha descrito mayor número de mutaciones (más de 700 frente a unas 450 en el BRCA-2) y se tiene un mayor conocimiento, y teniendo en cuenta que es responsable del 45% de los casos de cáncer de mama hereditario frente a un menor número de casos que resultan atribuibles al BRCA-2, será el BRCA-1 el gen objeto de nuestro estudio y para el que se enfocará el desarrollo de una metodología de detección de mutaciones por vía directa mediante el uso de biosensores. Por ello las características esenciales de este gen se describen a continuación.

3.3.2.2. El gen BRCA1

a) Estructura, expresión y función.

BRCA1 es un gen de gran tamaño, encontrándose repartido a lo largo de 117 kb de ADN genómico y generando transcrito de aproximadamente 5.7kb que da lugar a una proteína de 1863 aminoácidos. Está estructurado en 24 exones siendo sólo 22 de los 24, codificantes. De éstos, el 11, es el más grande de todos (3.5kb) [158].

La señal de iniciación del proceso de traducción se encuentra localizada en el exon 2 y la de finalización en el exon 24. La traducción a partir de la región codificante que contiene todos los exones da lugar a una proteína de 1863 aminoácidos con un peso molecular de 220 KD que se encuentra presente en todos los tejidos. Durante el proceso de traducción este gen sufre además el proceso de corte y empalme, más conocido por el término “splicing”, que da lugar a dos isoformas de la proteína, debido a la existencia de dos exones 1, que generan 2 transcritos distintos a partir de 2 promotores [158].

Por otra parte existe un gen llamado NBR-2, localizado en una región muy cercana a la 5' de BRCA1, pero que se transcribe en dirección opuesta; aunque tal proximidad no implica una relación funcional se piensa que ambos genes podrían estar corregulados a partir de un promotor común [180, 181].

En cuanto a la estructura de la proteína del BRCA-1, es de mencionar que posee una secuencia de aminoácidos que no tiene una fuerte homología con el resto de genes conocidos (Figura I11). Sólo pueden destacarse dos regiones:

- Una secuencia situada en la zona amino-terminal de BRCA1 (residuos: 20-68) conocida como “dominio de dedos de zinc” que es característica de muchos factores de transcripción. Parece estar implicada en la interacción de proteínas con el DNA y en la unión proteína-proteína [182]. De hecho, mediante el sistema del doble híbrido se ha localizado una proteína que interactúa con este dominio en dedos de zinc llamada BRAD1 [183, 184].
- Una secuencia en la zona carboxi-terminal de la proteína, conocida como dominio BRCT que aunque está poco conservada mantiene una cierta homología con otras proteínas implicadas en la reparación del DNA [185-187].

La transcripción de BRCA1 es inducida durante la fase G1 del ciclo celular y permanece alta durante la fase S [188]. Se expresaría justo antes de la división, cuando es necesario revisar el buen estado del ADN y reparar posibles daños, evitando la transmisión de estas alteraciones a la nueva copia. De esta forma, la función de BRCA1 parece estar relacionada con el mantenimiento de la integridad del genoma.

La expresión de este gen, al igual que el BRCA2, tiene una regulación hormonal [189] de forma que sus niveles de RNA mensajero aparecen elevados en células de cáncer de mama mediante una estimulación por estrógenos [190]. La similitud de su patrón de expresión con la del BRCA2 se atribuye a una corregulación de BRCA1 y BRCA2 [189], lo cual apoya la idea que ambos genes poseen una misma función que está implicada con el mantenimiento y reparación del genoma. Específicamente la proteína BRCA1 juega un papel de controlador negativo del crecimiento del tejido epitelial mamario, actuando en el núcleo de las células, donde normalmente se asocia con otras proteínas reguladoras como BRCA2. En esa localización puede acceder a los sitios de replicación que hayan sido dañados en el ADN y proceder a su reparación.

Asimismo se encuentra frecuentemente asociada a la proteína ARN polimerasa III, donde actuaría sobre los sitios de activación transcripcionales. Se comportaría como un activador del proceso de transcripción de determinados genes, la mayoría de éstos involucrados en el ciclo y crecimiento celular y particularmente, en genes estrógeno-dependientes involucrados en la proliferación del tejido epitelial mamario. Este mecanismo

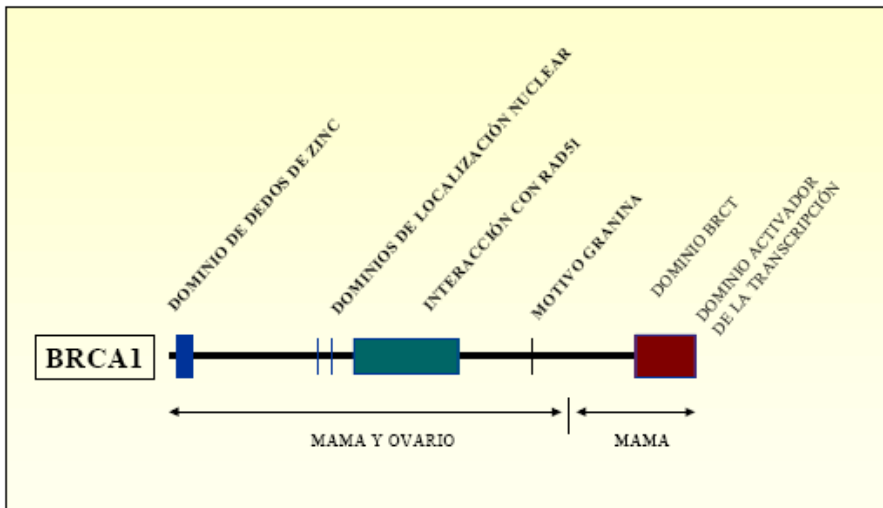


Figura I11. Estructura de la proteína del BRCA-1 con los dominios más significativos.

para el control transcripcional de BRCA1 parece llevarse a cabo mediante remodelamiento y control de la estructura y actividad de la cromatina.

Las mutaciones en el gen BRCA1 siguen un patrón de una herencia autosómica dominante que da lugar a una probabilidad del 50% de que cada uno de los descendientes herede una copia mutante del padre heterocigoto, independientemente del sexo de los portadores de la mutación. Sin embargo en el caso del cáncer de mama se han observado diferencias en la penetrancia entre los portadores femeninos y los masculinos. El cáncer de mama aparece solamente en los portadores femeninos de la mutación del gen BRCA-1. A pesar de que no existe evidencia de que el gen de la susceptibilidad heredada del cáncer de mama esté vinculado al cromosoma X, las mutaciones en este gen no se asocian con el cáncer de mama en los hombres [191]. La causa de esta aparente paradoja parece estar relacionada con la dependencia de los tejidos de mama y ovario con los niveles de estrógeno, aunque los mecanismos por los que tiene lugar esa mayor susceptibilidad al cáncer en mujeres portadoras es todavía hoy en día una cuestión sometida a debate [192, 193].

b) Mutaciones más frecuentes en el BRCA-1.

Pese a que se han descrito más de 600 mutaciones y variantes alélicas en el gen BRCA1 desde su identificación no se han encontrado regiones en las que se acumule un mayor número de mutaciones. Sólo las mutaciones fundadoras aparecen más frecuentemente en determinadas poblaciones por lo que el gran tamaño de estos genes, así como la dispersión y variedad de mutaciones que se registran en ellos, dificulta enormemente el análisis de mutaciones en poblaciones no endogámicas.

Las mutaciones en el BRCA-1 asociadas al cáncer de mama son generalmente mutaciones puntuales terminadoras que causan una finalización prematura de la proteína y por tanto una proteína truncada, debido a que afectan a la secuencia del marco de lectura o por la generación de un codón terminador (mutaciones sin sentido). Este dato puede estar en parte sesgado por la utilización de sistemas de detección que únicamente detectan mutaciones que generan una proteína truncada (como es el caso del PTT, Test de truncación de proteínas).

La mayoría de las mutaciones descritas hasta el momento son pequeñas delecciones, inserciones o mutaciones de pérdida de sentido que provocan el truncamiento de la proteína y por tanto la pérdida de función de ésta. También se dan mutaciones sustitutivas de cambio de sentido que generalmente conducen a una proteína defectuosa o con ligeras/amplias pérdidas de su funcionalidad. El significado biológico de la mayoría de las mutaciones de cambio de sentido detectadas es muy discutido y sus efectos funcionales van a depender mucho de la posición del aminoácido que cambie

y de lo brusco que sea el cambio. Otras mutaciones apenas generan daños en la proteína resultante (mutaciones silenciosas) por tener lugar en regiones no codificantes, aunque, de ocurrir en secuencias intrónicas pueden dañar puntos de corte y empalme y generar ARNm aberrantes que afecten a las diferentes isoformas de la proteína. Aparte de las mutaciones puntuales, se han descrito también delecciones/inserciones así como duplicaciones y reorganizaciones que pueden abarcar desde unas pocas bases a un amplio fragmento del gen [194, 195].

Por otra parte se ha descrito una delección de la región promotora. La alteración de estas zonas puede tener consecuencias graves en la transcripción [195, 196] aunque hasta ahora no han sido estudiadas.

Podemos encontrar también mutaciones en los sitios de corte y empalme o splicing que alteran la secuencia consenso que reconoce la maquinaria necesaria para el procesamiento del RNA mensajero primario con el fin de eliminar los intrones, generando una proteína truncada. Además de mutaciones en la secuencia consenso, variaciones en otras zonas del gen pueden generar nuevos sitios de splicing provocando de igual manera la alteración en la maduración del RNA mensajero.

Finalmente, la pérdida de heterozigosidad observada en parte de los cánceres esporádicos indica que pueden existir mutaciones somáticas en el alelo no perdido en estos genes [197, 198]. Sin embargo en los tumores de mama esporádico no se han encontrado mutaciones en el gen BRCA1 [199, 200] por lo que deben existir otros mecanismos mediante los cuales se pueda inactivar BRCA1. Se ha observado que muchos cánceres de mama esporádicos muestran una reducción de los niveles de RNA mensajero [201, 202]. Este hecho implica que algún mecanismo debe estar alterando la expresión de este gen. Esta reducción de la expresión podría estar provocada por una hipermetilación de la región promotora de este gen, ya que posee islas CpG susceptibles de metilación en las zonas promotoras, y se ha detectado hipermetilación de BRCA1 en cánceres de mama esporádicos [180, 201, 203-205].

Un resumen de las diferentes mutaciones y el número de ellas encontradas en el BRCA1 se recoge en la Tabla I3 [206].

3.3.2.3. Evaluación de riesgo genético en el cáncer de mama hereditario

Antes de que un tumor pueda detectarse y manifieste síntomas, tienen lugar muchos cambios a nivel genético y molecular, y pueden aprovecharse para realizar una detección más temprana.

En los últimos años las investigaciones en detección precoz del cáncer se están encaminando hacia el estudio de estos procesos, lo que ha generado

una nueva tendencia para abordar la detección precoz y seguimiento del cáncer.

Tabla I3. Resumen de las diferentes mutaciones y el número de ellas encontradas en el BRCA1

Tipo de mutación	Número de mutaciones
Sustituciones tipo silenciosas/sin sentido	260
Sustituciones en sitios de splicing	70
Sustituciones en regiones reguladoras	0
Pequeñas delecciones	241
Pequeñas inserciones	84
Pequeñas combinaciones de inserción/delección	8
Grandes delecciones	37
Grandes inserciones y duplicaciones	9
Reorganizaciones complejas, incluyendo inversiones	9
Variaciones repetitivas	0
Total	718

Podríamos diferenciar dos grandes aproximaciones o perspectivas: La primera, que podría denominarse molecular, consiste en la detección de biomarcadores que son biomoléculas presentes en el organismo del individuo afectado, en la sangre, en algunos líquidos del cuerpo -como la orina o la saliva- y algunos tejidos y cuya presencia o cantidad es indicadora de toxicidad en el organismo y en el caso del cáncer es indicativo del proceso de tumorigénesis en sí. Actualmente, es la mejor opción para pronosticar precozmente la existencia de cáncer en un individuo. Los biomarcadores son moléculas que produce el tejido canceroso de forma exclusiva o bien elementos cuya cantidad aumenta por encima de valores fisiológicos por efecto del tumor. Estos biomarcadores no sólo pueden indicar la presencia de un cáncer si no que permiten seguir su evolución.

La segunda aproximación, que podría denominarse genética, conllevaría:

a) *la identificación de patrones o eventos genéticos vinculados al proceso del cáncer*. Consiste en:

- identificar aberraciones cromosómicas, mutaciones puntuales o pérdida de la heterozigosidad a partir de muestras biológicas [207-211] en pacientes afectados de ciertos tipos de cáncer.

- medir el ADN/ARN circulante en plasma procedente del tejido tumoral [212, 213] con el fin de identificar i) mutaciones específicas típicas de los primeros estadios del cáncer como las del gen k-ras [214] ii) procesos de apoptosis [215], iii) aumento/deficiencia de la expresión de ciertos genes; iv) identificar patrones de metilación aberrante [216, 217] .

b) *El análisis genético de los individuos con una posible susceptibilidad genética* a un tipo de cáncer concreto con el fin de establecer la presencia real de las mutaciones asociadas a éste y al árbol genealógico familiar del mismo, permitiendo evaluar el factor de riesgo real del individuo y establecer las medidas de prevención adecuadas.

Para los propósitos de esta Tesis doctoral nos centraremos únicamente en la aproximación genética para la evaluación del riesgo o susceptibilidad al padecimiento de un tipo de cáncer concreto.

El conocimiento derivado de la investigación acerca de la influencia de la genética en el desarrollo de ciertos tipos de cáncer junto con el avance en las metodologías asociadas al análisis de mutaciones, han permitido desarrollar protocolos y estrategias de análisis que puedan aplicarse de forma generalizada y rutinaria en los programas de detección precoz de cáncer.

La posibilidad de identificación de esa mutación mediante tests genéticos permitirá realizar un diagnóstico temprano con frecuencia en pacientes asintomáticos y practicar en algunos casos una cirugía profiláctica, sugerir un pronóstico o aplicar terapia génica [167, 218].

Para indicar si procede hacer estos análisis genéticos a un paciente concreto primero se tiene que hacer una consulta de consejo genético donde se establecen los antecedentes familiares de la persona y se evalúa su probabilidad de tener un riesgo más elevado de sufrir cáncer respecto de la población general.

Como resultado del test genético se proponen medidas preventivas específicas que tienen en cuenta el riesgo de desarrollar cáncer como consecuencia de la mutación observada (consejo post-genético). En el caso de no observar ninguna alteración genética (aunque nunca hay un resultado fiable al 100%), el riesgo de la persona es similar al de la población general. Ésta es una de las consecuencias positivas del consejo genético: saber cuál es el riesgo real personal y sobre todo saber qué implicaciones tiene para los hijos.

El análisis de las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2, y su manejo clínico es un proceso enormemente complejo que plantea diversas limitaciones. Una de ellas es la detección de mutaciones cuya significación clínica se desconoce. Se han identificado más de 900 mutaciones en ambos genes, pero tanto el BRCA1 como el BRCA2, son genes de gran tamaño y

tienen una compleja estructura genética. Por otra parte, algunas alteraciones que cambian la secuencia de aminoácidos del producto son polimorfismos inocuos que no se traducen en un efecto clínico.

El análisis innecesario de estos dos grandes genes es costoso en términos de recursos humanos y económicos, y por tanto la historia familiar debe ser bien analizada para determinar cual es el gen con más probabilidades de tener una mutación.

Otra limitación, y quizá la más importante, es la inexistencia de medidas completamente satisfactorias en el caso de que exista una mutación. El seguimiento intensivo se puede efectuar sin la necesidad de conocer si la mutación está presente (en caso de pertenecer a una familia de riesgo), pero este conocimiento permite establecer cuál es el riesgo real personal y permite establecer medidas de seguimiento preferentes respecto del resto de pacientes. Los tests genéticos incluyen muchos tipos diferentes de análisis de laboratorio para determinar el estado genético de los individuos en los que ya se sospecha un alto riesgo para una condición particular heredada debido a una historia familiar [167, 218]. La elección entre una técnica u otra está determinada por el tipo de mutación buscada. Resulta conveniente diferenciar las técnicas de detección de mutaciones en función del origen y naturaleza de las mutaciones, como:

- a) mutaciones desconocidas
- b) mutaciones conocidas

y dentro de éstas, el abordaje se ve muy determinado por la naturaleza de la mutación:

- a) mutaciones heredadas (el individuo es portador de la mutación en uno o en los dos alelos pero en todas las células del cuerpo)
- b) mutaciones esporádicas (el individuo solo tiene afectadas un número determinado de células frente a un numero elevado de células salvajes)

Esta última clasificación es clave ya que existen técnicas que no poseen una elevada sensibilidad para la identificación de mutaciones en presencia de una elevada cantidad de ADN no mutado, como sería el caso de las mutaciones esporádicas, pero que sí serían apropiadas para la detección de mutaciones hereditarias en las cuales, el porcentaje de ADN salvaje vs mutado no puede superar el 50%. En el análisis del cáncer de mama heredado nos centraremos únicamente en la identificación de mutaciones heredadas ya sean conocidas o no.

3.3.3 TEST GENÉTICOS ACTUALES PARA LA DETECCIÓN DE MUTACIONES EN LOS GENES BRCA1 Y BRCA2

Desde el momento de la obtención de la muestra de sangre la realización de un análisis genético completo puede llevar desde algunas semanas a incluso meses dependiendo de la naturaleza y del número de genes que se van a examinar. Se puede reducir el tiempo si es posible identificar con cierta probabilidad de acierto, qué gen (entre más de un gen candidato) es más probable que tenga una mutación basándonos en la historia familiar. Por ejemplo una familia con muchos casos de CM y ovario y con ausencia de CM en varones nos haría sospechar de una mutación en el gen BRCA1 más que en el BRCA2. Si hay casos de ambos sexos con muchos miembros afectados, el gen BRCA2 puede estar implicado. También pueden surgir problemas si una familia tiene un gran número de individuos con CM sin otro tipo de cánceres, en cuyo caso ambos genes deben ser examinados [167].

La identificación de la mutación causal requiere un planteamiento amplio recurriendo de forma paralela a un conjunto de técnicas (ver tablas I3 e I4) en función del objetivo a buscar [219].

A continuación se detallan los métodos más frecuentemente empleados en la identificación de mutaciones en función de si la mutación a identificar es de origen conocido o no.

Cuando se hace una búsqueda de una posible mutación desconocida dentro de un gen grande, como es el caso del BRCA, una de las primeras opciones es la de realizar un *test de truncación de proteínas o PPT* (del inglés, Protein Truncation Test). En este test la región codificante de un gen es analizada en busca de mutaciones que conlleven la terminación prematura de la proteína durante el proceso de la traducción de la misma, lo que daría lugar a una proteína no funcional [220-222]. La mayor ventaja de este procedimiento es que sólo revela la presencia de mutaciones funcionales por lo que no generaría falsos positivos debido a mutaciones silenciosas o polimorfismos (SNP).

Una estrategia alternativa sería emplear otras técnicas encaminadas a detectar de forma precisa mutaciones puntuales y pequeñas delecciones o inserciones. Estas técnicas por lo general solo identifican la presencia de una mutación y se necesita llevar a cabo la secuenciación del fragmento de PCR en el que se observó el desajuste. De entre ellas las más empleadas son el análisis de conformación de polimorfismos de cadena sencilla o SSCP, el análisis de heteroduplex o HET, la electroforesis en gradiente de gel desnaturizante (DGGE o TGGE) y las técnicas denominadas de ruptura por métodos químicos o CCM.

El *análisis de conformación de polimorfismos de cadena sencilla o SSCP* (de las siglas en inglés, Single Strand Conformation Polymorphism) consiste en una

separación electroforética de las cadenas de ADN, basándose en la diferencia en secuencia entre ellas (generalmente una sola base) y que da lugar a una estructura secundaria distinta que conlleva diferencias en su movilidad electroforética [223]. Esta técnica permite distinguir entre dos secuencias de ADN muy similares, sólo basada en la forma específica de sus estructuras de cadena simple.

El *análisis de heteroduplex o HET* (del inglés, HETeroduplex analysis) estudia la movilidad del ADN heteroduplex sometido a electroforesis en geles de poliacrilamida [224]. La reducción en la movilidad del ADN heteroduplex, comparada con la del ADN homoduplex, es proporcional al grado de divergencia de las secuencias. Al igual que en el SSCP no se emplean condiciones desnaturizantes. Presenta la enorme ventaja de no requerir la optimización de las condiciones en las que se realiza la electroforesis ya que son constantes para la mayoría de los fragmentos. Para SSCP sin embargo las condiciones deben optimizarse en cada caso, para obtener la máxima sensibilidad, por lo que es un método que tiene tiempos de ejecución más largos. Ambos métodos son muy efectivos para el análisis amplio de mutaciones, especialmente cuando se busca dentro de fragmentos de gran tamaño y en diferentes pacientes. Sin embargo no todas las mutaciones son detectadas y ninguno permite el análisis de fragmentos de gran tamaño.

La *electroforesis en gradiente de gel desnaturizante (DGGE o TGGE)* es una variante de la electroforesis tradicional, que permite detectar variaciones de una sola base, así como pequeñas inserciones/delecciones en la secuencia de ADN [225]. Permite la detección de un mayor número de mutaciones que SSCP, pero cuenta con la desventaja de que las condiciones deben optimizarse para cada uno de los fragmentos de PCR, por lo que no es práctica en caso de genes de gran tamaño como el BRCA, con elevado número de exones para analizar.

Las *técnicas de ruptura por métodos químicos CCM o enzimáticos* (del inglés, Chemical Cleavage Method) consisten en analizar los fragmentos obtenidos tras la aplicación de un método que corta la secuencia de ADN en un sitio concreto. La presencia de una mutación contribuye a generar o destruir el sitio de corte, lo que afecta al tamaño final del fragmento obtenido. Permiten detectar prácticamente el 100% de mutaciones y el análisis de fragmentos de gran tamaño, pero dado que requieren un largo número de etapas y el uso de reactivos tóxicos, resulta una técnica poco frecuente en comparación a SSCP o HET.

Finalmente existe la alternativa de emplear la *secuenciación directa* del gen para identificar una posible mutación. La secuenciación directa es la técnica disponible más sensible y específica, pero su realización a gran escala de fragmentos grandes de DNA es laboriosa y muy costosa.

En el caso de iniciar la búsqueda de una mutación conocida las técnicas a emplear suelen variar ligeramente. En estos casos lo habitual es realizar una PCR que amplifique el segmento de ADN que contiene la mutación. A partir de aquí se procede con diferentes métodos: análisis de fragmentos de restricción o RLFP, hibridación con oligonucleótidos alelo-específicos o ASO, amplificación alelo-específica o ASA o ensayos de extensión/ligación. Alternativamente, se pueden llevar a cabo ensayos de detección dentro de la propia etapa de PCR, empleando técnicas de la PCR en tiempo real o la utilización de diferentes tipos de sonda, como las “sondas Taqman”.

El *análisis de fragmentos de restricción o RLFP* (del inglés, *Restriction Length Fragment Polimorphism*) consiste en el uso de enzimas de restricción que cortan en sitios específicos donde se presume está la mutación, de modo que se obtienen fragmentos de diferente longitud en función de la presencia o no de la mutación buscada que son luego analizados por electroforesis.

La *hibridación con oligonucleótidos alelo-específicos* o ASO (del inglés, *Allele-Specific Oligonucleotides*) constituye un conjunto de técnicas (southern blot, dot-blot, reverse dot-blot, PODGE) con un concepto similar al del southern blot en los que la secuencia problema se hibrida con una sonda de secuencia conocida [226, 227]. La identificación de la versión mutante se basa en la diferente eficiencia de hibridación respecto a la versión salvaje. La *hibridación en chips de ADN* es una extensión de este concepto. Implica la hibridación en soporte con una sonda de secuencia conocida y previamente fijada a este. En este caso se tienen sondas con las cuatro posibles variantes para una posición nucleotídica de modo que por detección, normalmente fluorescente, se visualiza cual de las posibles sondas se ha unido al fragmento de PCR del paciente. Está limitada a fragmentos pequeños y tiene el condicionante de ser una técnica muy costosa por lo que su uso es limitado.

La *amplificación alelo-específica o ASA* (del inglés, *Allele-Specific Amplification*) consiste en realizar una amplificación por PCR usando dos posibles cebadores en paralelo, uno complementario a la secuencia salvaje y otro a la mutante, de modo que sólo uno de los dos será amplificado. Existen diferentes versiones y modificaciones del método, tales como ARMS, ASPCR, PASA, COP o CCA [228]. Los *ensayos de extensión* son muy similares a la técnica de ASA sólo que se lleva a cabo una extensión desde el extremo 3' del cebador usando un nucleótido marcado con radiomarcaje (^{32}P ó ^3H). La extensión tiene lugar cuando el nucleótido marcado es complementario al correspondiente en el ADN molde. Este método también se conoce como minisequenciación por su similitud con las técnicas de secuenciación. Los productos obtenidos por este método se analizan posteriormente por electroforesis en función de sus movilidades relativas. Una ventaja de este método es que se ha podido adaptar a fase-sólida de modo que es una técnica susceptible de ser automatizada [229].

Los *ensayos de ligación u OLA* (del inglés, *Oligonucleotide Ligation Assay*), son similares a los anteriores, pero en este caso los cebadores se diseñan para unirse a ambos lados del sitio donde se supone que está la mutación, de modo que el extremo 3' del cebador está situado justo en la posición contigua al extremo 5' del segundo cebador. Así la enzima ADN ligasa sólo será capaz de realizar la ligación entre los dos cebadores cuando exista un hibridación perfecta entre éstos y el DNA molde. Los productos de la ligación se amplifican mediante una reacción de PCR múltiplex que utiliza como cebadores las secuencias universales presentes en los oligonucleótidos. Si hay mutación en el extremo 3' del primer cebador no habrá ligación, lo que afectará al tamaño de los fragmentos obtenidos tras la PCR [230]. Existen variantes de este método en el que se usan cebadores marcados, permitiendo una detección óptica en lugar de analizarlos por movilidad electroforética, lo que además permite una mayor estandarización del método.

El gran tamaño de los genes BRCA1 BRCA2 dificulta enormemente la realización de la detección: el análisis de secuencia limitado a los exones y a las regiones intrónicas adyacentes implica la determinación de la secuencia de unos 5.000 pares de bases para el BRCA1 y de 10.000 para el BRCA2. Incluso con este esfuerzo técnico, las mutaciones en las regiones intrónicas y las deleciones totales del gen no son detectadas.

La secuenciación es la alternativa más fiable para identificar una mutación desconocida, pero dado que ambos genes son de gran tamaño, resulta muy costosa. El análisis de heterodúplex o el de las conformaciones de los polimorfismos de cadena sencilla (SSCP) puede reducir el número de muestras necesario para la secuenciación, pero la sensibilidad de estos ensayos es variable.

Con otros métodos de detección hay una sensibilidad más baja cuando se compara con la secuenciación. Los ensayos como la hibridación de oligonucleótidos alelo-específica o el test de truncamiento de proteínas tienen la limitación de detectar sólo tipos específicos de mutaciones.

El análisis de truncamiento de proteínas es más rápido y menos costoso que la secuenciación del gen completo. Sin embargo para los genes BRCA1 y BRCA2 este método sólo es capaz de identificar el 70-90% de las mutaciones por lo que un individuo puede presentar riesgo de desarrollar el cáncer incluso si el test es negativo. También puede ocurrir que el cáncer familiar se deba a otros genes no descubiertos o analizados.

En Estados Unidos estos test únicamente pueden realizarse en los laboratorios genéticos Myriad (Salt Lake City, UT) debido a las restricciones que implican sus numerosas patentes. Estos laboratorios además de ser los responsables de los hallazgos del BRCA-1 [158] y co-descubridores del BRCA- 2 junto con los investigadores del centro de investigación sobre Cáncer de Reino Unido [160, 166], son pioneros en el desarrollo de test

genéticos como el BRACAnalysis® propuesto en 1996 [231]. En Europa aún no existen restricciones en cuanto al análisis genético de estos genes ya que las patentes registradas en UK, fueron cedidas a organismos públicos. La única excepción la constituye el análisis de las mutaciones descritas en los individuos descendientes de judíos Ashkenazi, cuya patente perteneciente a los laboratorios Myriad también ha sido licenciada en Europa [232].

Los laboratorios Myriad realizan tres tipos de test dependiendo del perfil del paciente:

- **BRACAnalysis® completo (\$2,760):** incluye test, tanto para el BRCA-1 como para el BRCA2, así como para ciertas regiones intrónicas, próximas a los extremos 3' y 5' de los diferentes exones:

BRCA1: Determinación completa de la secuencia en ambos sentidos, directo y reverso, comprendiendo 5400 pares de bases que incluyen 22 exones codificantes y 750 pares de bases correspondientes a regiones intrónicas adyacentes. Los exones 1 y 4, que no son codificantes, no se analizan.

BRCA2: Determinación completa de la secuencia en ambos sentidos, directo y reverso, comprendiendo 10200 pares de bases que incluyen 26 exones codificantes y 900 pares de bases correspondientes a regiones intrónicas adyacentes. El exon 1, que no es codificante, no se analiza.

Este análisis también puede incluir la detección de cinco grandes reordenamientos en el gen BRCA-1 y descritos en determinados grupos poblacionales: Una delección de 3,8kb en el exon 13 y otra de 510pb en el exon 22, presentes en un cierto porcentaje de la población holandesa [194], asimismo una duplicación de 6kb en el exon 13 recogida en diversos grupos geográficos [233] y otra de 6kb en el exon 13 descrita en individuos europeos particularmente británicos así como una delección de 7,1kb también descrita en la población europea [234].

- **BRACAnalysis® puntual (\$325):** Se busca una mutación puntual específica ya descrita en los antecedentes familiares del paciente.

- **BRACAnalysis® de tres sitios (\$385):** Se analizan porciones específicas de los genes BRCA-1/2 para detectar las mutaciones 185delAG y 5382insC del BRCA1 y 6174delT del BRCA2 típicas de individuos descendientes de los judíos Ashkenazi [176-178].



MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental para la puesta a punto de un sistema analítico de detección de mutaciones vinculadas al BRCA-1 por medio de un dispositivo biosensor se ha llevado a cabo de la siguiente forma:

- i) Caracterización de las condiciones y factores que afectan de forma directa a los procesos de inmovilización e hibridación de ADN tanto en el biosensor nanomecánico como en el biosensor SPR. Además se han empleado técnicas *ex situ* para confirmar experimentos y resultados. Para esta caracterización se han empleado *secuencias genéricas* de ADN de corta longitud (oligonucleótidos de 12 mer).
- ii) Optimización de la detección de mutaciones en el dispositivo biosensor que mejor niveles de sensibilidad presenta usando una secuencia también de carácter genérico de 25 mer de longitud.
- iii) Optimización de la detección de mutaciones en ese mismo dispositivo biosensor empleando *secuencias tipo PCR* correspondientes a la secuencia del amplicón que se obtendría tras la realización de una PCR si se tratase de una muestra real. Las *secuencias tipo PCR* han sido diseñadas para cuatro mutaciones descritas en el BRCA-1 son además, las empleadas para la puesta a punto de un sistema de detección multianalito con biosensores.

Conforme a este esquema se describen a continuación los materiales y métodos empleados.

4.1 Selección de secuencias ADN y preparación de muestras reales para la detección del cáncer de mama heredado.

4.1.1 SECUENCIAS DE ADN DE CARÁCTER GENÉRICO

Los oligos de ADN (Tabla M1) han sido diseñados de modo que presenten escasa auto complementaridad para evitar la aparición de estructuras secundarias que puedan dificultar los procesos de hibridación. Se han utilizado oligos comerciales (Genomechanix, USA) en los que se ha introducido una funcionalización mercapto en 5' para estudiar los procesos de inmovilización. Se han empleado tipos diferentes de grupos mercapto:

- i) grupo mercapto (-SH) en 5' $HS-(CH_2)_6$ -Oligo,
- ii) grupo disulfido que presenta a su vez un grupo protector dimetoxitrityl (DMTO) acoplado al puente disulfuro que une la cadena de ADN: $DMTO-S-S-(CH_2)_6$ -Oligo,
- iii) grupo disulfido con el puente disulfuro acoplado a dos cadenas de oligo. Esta molécula constituye la forma dimérica del oligo con funcionalización SH- : Oligo- $(CH_2)_6$ -S-S- $(CH_2)_6$ -Oligo.

Para los experimentos de fluorescencia y radiomarcaje se ha añadido durante la síntesis comercial el marcaje con CY3 o ^{32}P en el extremo opuesto al funcionalizado por un grupo mercapto en los estudios de inmovilización; mientras que para los estudios de hibridación el fluoróforo se incorpora en el extremo que corresponda del oligo complementario de modo que se obtenga una configuración en la que el fluoróforo quede siempre lo más alejado posible de la superficie para evitar fenómenos de *extinción de la fluorescencia* ("quenching") con el oro.

La secuencia de carácter genérico empleada tiene dos longitudes, 12 y 25 mer en función del experimento:

- La de 12mer corresponde a 5'-AAC GAC GGC CAG-3'. Este tamaño se elige para mimetizar las condiciones de hibridación de la secuencia escogida del BRCA1 cuyo tamaño oscila entre los 11-16 nucleótidos.

A esta secuencia le ha sido incorporada en el extremo próximo al grupo mercapto una secuencia de timinas (T_x) como espaciador vertical, cuya finalidad es alejar de la superficie sólida la zona de la cadena-sonda donde se va a producir la hibridación. El número de timinas (x) empleado es variable según los experimentos (X=0 a X=20). La cadena complementaria de 12 nucleótidos empleada en la hibridación es 5'-CTG GCC GTC GTT-3'. Los experimentos de control se han realizado con la secuencia 5'-AAC GAC GGC CAG-3'.

- La secuencia de ADN del oligonucleótido de longitud 25 mer corresponde a la 5'-GACGTTGTAAACGACGGCCAG-3' siendo su complementaria la

5'-CTGGCCGTCGTTTACAAACGTC-3' y su control la secuencia 5'-GACCGGCAGCAAAATGTTGCAG-3'.

Tabla M1. Colección de secuencias de oligos usadas durante los experimentos de inmovilización e hibridación de ADN con secuencias cortas no vinculadas al BRCA-1.

Nombre	Oligonucleotido
12mer	5'-AACGACGGCCAG-3'.
SH12mer	5'-SH-C6-AACGACGGCCAG-3'
SS-DMTO-12mer	5'-DMTO-S-S-C6-AACGACGGCCAG-3'
12DimerSS	5'-GACCGGCAGCAA-3'-C6-S-S-C6-3'-AACGCAGGCCAG-5'
SS-DMTO-12merT15	5'-DMTO-S-S-C6-TTTTTTTTTTTTTTTTAACGACGGCCAG-3'
SH25mer	5'-SH-C6-GACGTTGTAAAACGACGGCCAG-3'
12mer- Cy3	5'-AACGACGGCCAG-Cy3-3'
SH12mer-Cy3	5'-SH-C6-AACGACGGCCAG-Cy3-3'
SS-DMTO-12mer Cy3	5'-DMTO-S-S-C6-AACGACGGCCAG-Cy3-3'
CY3-12T15DimerSS	5'-CY3-GACCGGCAGCAATTTTTTTTTTTTTTTT-3'-C6-S-S-C6-3'-TTTTTTTTTTTTTTTAACGCAGGCCAG-Cy3-5'
SH 12T0	5'-GACCGGCAGCAA-C6-SH -3'
SH 12T5	5'-GACCGGCAGCAATTTTTT- C6-SH -3'
SH 12T10	5'-GACCGGCAGCAATTTTTTTTTTTT- C6-SH -3'
SH 12T15	5'-GACCGGCAGCAATTTTTTTTTTTTTTTT- C6-SH-3'
SH 12T20	5'-GACCGGCAGCAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT- C6-SH-3'
SH 12T25	5'-GACCGGCAGCAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-TT-TT-C6-SH-3'
12COMP	5'-CTG GCC GTC GTT-3'
Cy3-12COMP	5'-CY3-CTG GCC GTC GTT-3'
25merCOMP	5'-CTGGCCGTCGTTTACAAACGTC-3'
P32-12COMP-Cy3	5'- ³² P-TTGCTGCCGGTC-Cy3-3'

4.1.2 SECUENCIAS DE ADN PORTADORAS DE MUTACIONES EN EL GEN BRCA-1

Como ya se describió en la Introducción, el gen BRCA-1 es de gran tamaño. Está situado en el cromosoma 17 y genera un transcrito también de elevado tamaño, entorno a 5,2 kb. Por esta razón existen muchas posiciones susceptibles de ser mutadas como lo demuestra el gran número de mutaciones descritas en dicho gen. Por ello ha sido necesario seleccionar un

pequeño número de ellas como muestra representativa que permita poner de manifiesto la viabilidad del sistema biosensor como herramienta de detección de dichas mutaciones. Para este trabajo se han escogido cuatro secuencias cuyos criterios de selección son los siguientes:

- Se han escogido secuencias con mutaciones descritas en la literatura de interés y relevancia desde el punto de vista biológico.
- Se definen como secuencias de relevancia biológica a las citadas con mayor frecuencia en la base de datos del Breast Cancer Information Core (BCIC, <http://research.nhgri.nih.gov/bic/>). Esta base de datos constituye un referente científico mundial para los estudios relativos al BRCA-1, ya que en ella se depositan todas las mutaciones conocidas de este gen.
- Se han escogido secuencias con diferentes tipos de mutaciones representativas de todos los tipos de mutaciones descritas en este gen. Se han seleccionado tanto mutaciones puntuales, como pequeñas inserciones/delecciones cuyos efectos en la secuencia final de la proteína genere una versión no funcional. Son por tanto, mutaciones de cambio de sentido, terminadoras o que afectan al marco de lectura, ya que esas mutaciones son las candidatas más probables para la generación de una proteína no funcional.
- No se han considerado mutaciones de gran tamaño, como reordenamientos, grandes inserciones/delecciones o duplicaciones ya que el sistema biosensor propuesto se plantea como una alternativa a los métodos de detección de pequeñas mutaciones.
- Las secuencias elegidas poseen una longitud de entre 11-16 nucleótidos, conteniendo la mutación en la zona central de la misma, para asegurar la máxima especificidad.
- La temperatura de fusión o melting de todas las secuencias se ha ajustado para que la hibridación sea homogénea en todas ellas y que el proceso de detección en el biosensor pueda realizarse a temperatura ambiente.

En base a estos criterios, se han seleccionado cuatro secuencias de ADN vinculadas a mutaciones en el gen BRCA-1 (Tabla M2). Estas mutaciones son:

- 916delTT: Es una mutación que consiste en la delección de dos timinas que producen un cambio en el marco de lectura de la proteína resultando en la terminación prematura de la proteína en el codón 285
- 185delAG: Es una de las mutaciones fundadoras de los judíos Ashkenazi. Consiste en una delección de una adenina y una guanina

Tabla M2. Secuencias portadoras de las mutaciones relativas al BRCA-1. Las delecciones son mostradas en rojo en la columna correspondiente al fenotipo salvaje (WT). El orden de las secuencias en la Tabla corresponde a su posición en la secuencia cDNA del gen BRCA-1.

Nº	Nombre	Secuencia Salvaje (WT)	Secuencia Mutante (M)	Tipo	Tm	Posición cDNA 5'
1	185delAG	AAATCTT AG AGTGTCC	AAATCTTAGTGTCC	DEL 2	38	179
2	916delTT	GTTCTGT TT CAAACT	GTTCTGTCAAACT	DEL 2	36	910
3	R1443X	GACCTGCGAAATC	GACCTG T GAAATC	C->T	38	4440
4	5382insC	AGAATCCCAGG	AGAAT C CCCAGG	INS 1	38	5378

en la posición 185 del gen BRCA-1 y provoca al igual que en la mutación 916delTT una alteración en el marco de lectura que genera una terminación prematura de la síntesis de la proteína.

- R1443X: Es una mutación que consiste en el cambio de una citosina por una timina que conlleva la terminación prematura de la síntesis de la proteína en el codon 1443
- 5382insC: Es también una mutación fundadora de los judíos Ashkenazi. Consiste en la inserción de una citosina en el codon 1755 que conlleva un cambio en el marco de lectura generando una proteína truncada.

Con el fin de desarrollar un formato de detección lo más próximo posible a las condiciones de una muestra real se desarrolló la detección empleando, en lugar de las secuencias cortas de 11-16 bases, una cuya secuencia fuera exactamente igual a la que se obtendría en el amplicón tras la realización de la PCR con los cebadores mostrados en la Tabla M3. Estas secuencias tienen un tamaño de entre 55-65 bases y se detallan en la Tabla M4. Con estas secuencias se ha optimizado un formato de detección uni- y multi-analito.

Dado que el objetivo a la hora de diseñar las secuencias para su detección en el biosensor es diferenciar con claridad a los pacientes portadores de la mutación (fenotipo mutante, M) frente a los pacientes sanos (fenotipo salvaje, WT), la secuencia empleada en la inmovilización corresponde a la hebra directa (Fw) del fenotipo mutante de modo que la posterior hibridación de ésta con la secuencia de un paciente enfermo (portador de la mutación) de la máxima señal en el biosensor al ser ambas perfectamente complementarias.

Selección de secuencias de ADN y preparación de muestras reales de pacientes con cáncer de mama heredado

Tabla M3. Relación de cebadores que se emplearían en la PCR para la obtención del amplicón correspondiente en la muestra real de un paciente. Se incluye el la temperatura de fusión de cada uno de ellos, así como el tamaño del amplicón generado.

916delTT		
<i>Cebadores</i>		<i>Tamaño amplicon</i>
Fw: GGCATCCAGAAAAGTATCAGGGTA	Tm: 63°C	
Rv: TGCCACATGGCTCCACATGCA	Tm: 66°C	58-60 nt
185delAG		
<i>Cebadores</i>		<i>Tamaño amplicon</i>
Fw: CAAATGTCATTAAATGCTATGCAGA	Tm: 55,4°C	
Rv: CTTGTGCTGACTTACCAGATGG	Tm: 61°C	62-64 nt
R1443X		
<i>Cebadores</i>		<i>Tamaño amplicon</i>
Fw: CATAAGTGACTCTCTGCCCCTTGAG	Tm: 63°C	
Rv: TTTTCTGATGTGCTTTGTCTG	Tm: 57°C	61 nt
5382insC		
<i>Cebadores</i>		<i>Tamaño amplicon</i>
Fw: CAAGGTCCAAAGCGAGCAAG	Tm: 60,6°C	
Rv: AGGGAGCTTTACCTTTCTGTC	Tm: 60,3°C	51-52 nt

Por el contrario la hibridación con la secuencia del paciente sano estará desfavorecida debido al desajuste de secuencias durante la hibridación, dada la ausencia de la mutación correspondiente con respecto a la secuencia inmovilizada, generando una menor respuesta en el sensor que es claramente diferenciable de la anterior. Con esta premisa la secuencia destinada a la inmovilización corresponde a la hebra directa (fw) y contiene la mutación correspondiente y está modificada en el extremo 5' con un grupo sulfidrilo para su anclaje a la superficie de oro, mientras que las secuencias complementarias M-Rv y WT-Rv corresponden a la secuencia reversa (Rv) siendo únicamente la secuencia M-Rv, la que porta la mutación y es perfectamente complementaria a la secuencia inmovilizada. Como controles negativos se usan oligos con las secuencias de idéntica composición a la inmovilizada, la hebra Fw, con la salvedad de que no poseen el grupo sulfidrilo.

Tabla M4. Secuencias *tipo PCR* empleadas para la optimización de la detección con biosensores de mutaciones relativas al BRCA-1 en formato multianalito. En verde se destaca la secuencia implicada en la hibridación y en rojo la posición de la mutación. Las siglas Fw hacen referencia a la hebra directa 5'-3', mientras que las siglas Rv hacen referencia a la hebra reversa 3'-5'. Todas las secuencias están escritas en el sentido 5'-3'. La siglas M y WT hacen referencia a los fenotipos mutante y salvaje, respectivamente.

Nombre la mutación portadora	185delAG	916delTT	R1443X	5382insC
Tipo de mutación en hebra directa (fw)	DELECCIÓN AG	DELECCIÓN TT	TRANSICIÓN C->T	INSERCIÓN C
Secuencia mutante inmovilizada Fw	SH- TTTTTTTTTTTTAAAT CTAGTGTCC	SH- TTTTTTTTTTTTGTTCTGT CAAAC	SH- TTTTTTTTTTTTGACCTG TGAAAT	SH- TTTTTTTTTTTTAGAATC CCCAG
Secuencia complementaria M-Rv	CTTGATCAACTCC AGACAGATGGGA CACTAAGATTCT GCATAGCATTAAT GACATTTTG	TGCCACATGGCTCCA CATGCAAGTTTGACAG AACTACCCTGATACTT TCTGGATGCC	TTTCTGATGTGCTTTGTT CTGGATTTCACAGGTC CTCAAGGGCAGAAG AGTCACTTATG	CCCCCTGAAGATCTTT CTGTCCTGGGGATTCT CTTGCTCGCTTTGGAC
Secuencia complementaria WT-Rv	CTTGATCAACTCC AGACAGATGGGA CACTAAGATTCT CTGCATAGCATTA ATGACATTTTG	TGCCACATGGCTCCA CATGCAAGTTTGAAAC AGAAGTACCCTGATA CTTTCTGGATGCC	TTTCTGATGTGCTTTGTT CTGGATTTCGAGGTC CTCAAGGGCAGAAG AGTCACTTATG	CCCCCTGAAGATCTTT CTGTCCTGGGGATTCT TGCTCGCTTTGGAC
Tm	38	36	38	38
Posición cDNA 5'	179	910	4440	5378

4.2 Descripción de los sistemas biosensores empleados.

4.2.1 BIOSENSOR DE RESONANCIA DE PLASMÓN SUPERFICIAL (SPR).

Para el desarrollo de esta tesis se ha hecho uso de un biosensor SPR comercializado por la empresa Sensia, spin-off de nuestro grupo de investigación (Figura M1). Este biosensor utiliza la configuración de Kretschman que es la más empleada debido a su simplicidad. La configuración de Kretschmann permite utilizar dos modos de medida siguiendo la variación del ángulo de acoplamiento de resonancia o la variación de la intensidad de la luz reflejada a ángulo .

El biosensor de SENSIA puede trabajar con el sistema de medida a ángulo fijo, también denominado cinético o el de medida de la intensidad a ángulo variable. Este último modo de medida permite monitorizar en tiempo real tanto procesos de adsorción de biomoléculas en la superficie como la interacción de las biomoléculas ancladas en la superficie con su respectivo analito diana, por lo que ha sido el modo de trabajo escogido. Para ello el

conjunto formado por placa sensora, prisma, cubetas de flujo y fotodetector se encuentra montado sobre un banco giratorio con una resolución angular de $0,01^\circ$ como se muestra en la Figura M1.

Para seleccionar el ángulo de medida es preciso medir previamente la curva de resonancia que representa la variación en la intensidad de luz reflejada con respecto al ángulo de incidencia mientras el índice de refracción de la disolución permanece constante. Para obtener la curva de resonancia el banco rotatorio se mueve de forma manual $0,17^\circ$ cada 5 segundos hasta completar el recorrido de la curva de resonancia.

Cuando se fija el ángulo de trabajo a uno u otro lado del mínimo los cambios en el índice de refracción del medio adyacente a la superficie provocan una variación en el ángulo de la luz reflejada que se traducen en el desplazamiento de la curva de reflectividad. En este modo de medida, habitualmente se fija un ángulo de medida que se encuentre a la izquierda del mínimo (ángulos menores) ya que en esa zona las pendientes de las curvas de reflectividad antes y después de la interacción son prácticamente paralelas y, en consecuencia, el aumento en la reflectividad es directamente proporcional al desplazamiento del mínimo.

Para la monitorización de la muestra a determinar este dispositivo registra cada segundo los cambios en el índice de refracción de la disolución en contacto con la superficie sensora. En nuestro sensor la excitación de la onda de plasmón de superficie se consigue mediante un diodo láser (módulo de RS 194-032), que emite luz a una longitud de onda de 670 nm con una potencia de 3 mW. Debido a que el sensor permite utilizar dos canales de medida el haz láser se divide en dos haces iguales mediante un divisor de haz específicamente fabricado para este fin. Esta configuración permite realizar dos medidas diferentes por cada canal o bien utilizar uno de ellos como canal de referencia. Para dividir el haz se emplea un cubo de 5 mm de lado mediante el que se obtiene una separación de 3.1 mm entre haces. Los dos haces de luz se hacen pasar por un prisma de acoplamiento óptico con un índice de refracción igual a 1.52.

Después de atravesar el prisma la luz incide en la parte posterior de una placa de cristal metalizada con 45 nm de oro. Con el fin de mejorar la adherencia de la capa de oro y evitar así que se desprenda al trabajar en medios líquidos esta antes del depósito de l oro se ha depositado previamente una capa de 5 nm de cromo. La parte metalizada de la placa está en contacto a su vez con dos cubetas de flujo por las que llegan las disoluciones que se pretenden analizar.

Antes de cada medida la superficie de oro se limpia por inmersión en tricloroetileno-acetona-etanol-agua durante 1 min en cada una de ellas con un paso de 1 min por ultrasonidos entre cada una de ellas. Seguidamente se sumerge en una solución *piraña* (30% de H_2O_2 y 70% de H_2SO_4) durante

unos segundos para eliminar cualquier resto orgánico. A continuación se introduce el sustrato en agua destilada y se seca con pistola de nitrógeno.

El sistema de flujo consta de dos cubetas fabricadas en metacrilato mediante micromecanizado dispuestas en dirección vertical tal como indica la Figura M3. Las dimensiones de cada cubeta son 2 mm de diámetro y 0,1 mm de profundidad y se encuentran separadas por una distancia de 1 mm (volumen ~ 300 nL). El sellado de la misma se lleva a cabo mediante un “O”-ring de parafilm entre ésta y la placa de oro. El prisma se coloca detrás de la placa sensora y entre esta y el prisma se pone un medio de un aceite de igual índice de refracción que el del prisma. Finalmente se sella mediante un sistema de ajuste que ejerce presión sobre la placa. Cada cubeta posee su propio circuito de entrada y salida que se conecta al sistema de flujo y a las bombas que impulsan la muestra. El pequeño volumen de cada celda permite controlar mejor el proceso de difusión de la muestra hacia la superficie sensora.

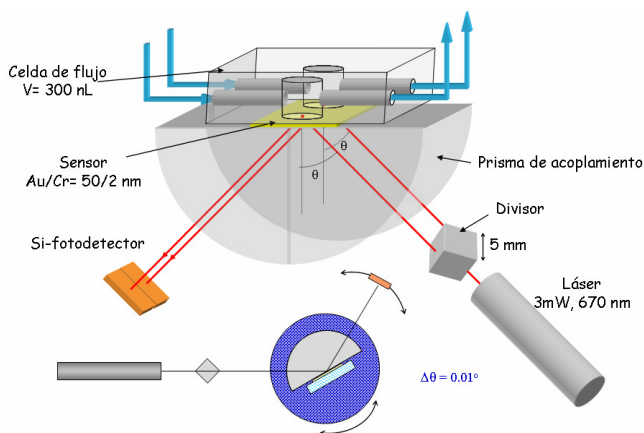
El movimiento de los fluidos se consigue mediante la utilización de dos bombas peristálticas de modo que las disoluciones se hacen llegar a la superficie sensora por bombeo de los mismos a través de un circuito de tubos de teflón y dos válvulas de inyección.

Una de las bombas trabaja a velocidad variable y se emplea para mantener un flujo constante sobre la superficie sensora, uno para cada celda de flujo. La velocidad óptima de medida debe seleccionarse atendiendo a la difusión del flujo y no a la cantidad de masa que llega a la cubeta.

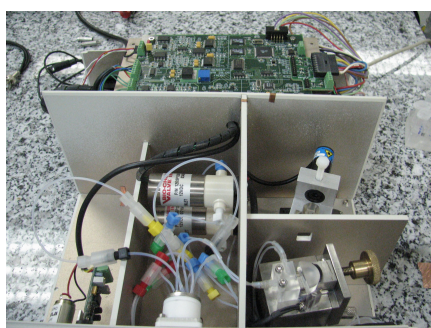
La función de la segunda bomba es introducir las muestras en las cubetas mediante un sistema de pulsos. Las válvulas de inyección se encuentran conectadas a través de las tuberías del circuito por un lado a los canales de la bomba de velocidad fija, y por el otro, a cada cubeta. Su función consiste en introducir un volumen fijo de muestra en la corriente de buffer. Para ello utiliza dos posiciones: una de *carga* que llena un bucle de 300 μ L con la muestra y otra de *inyección* a través de la cual se permite que la muestra se dirija hacia la cubeta. La adquisición de la señal se realiza mediante un fotodiodo de dos cuadrantes Hamamatsu (modelo S5870) y una electrónica para capturar los datos así como para amplificar y filtrar la señal recogida.

La señal correspondiente a las medidas se evalúa mediante un software implementado en Labview 7.1 que genera una interfaz gráfica que facilita cualquier interacción del usuario con el ordenador al tiempo que permite inicializar el hardware, controlar la velocidad de flujo de las bombas, programar la adquisición de datos y modificar parámetros tanto de la adquisición como de la representación durante el transcurso de la operación.

a)



b)



c)

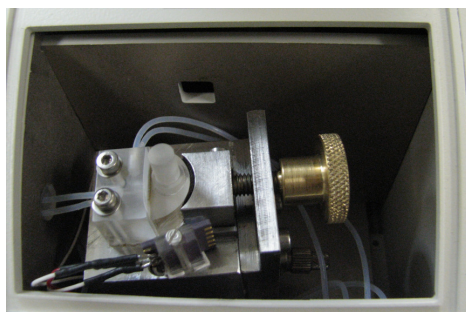


Figura M1. a) Esquema de la configuración y los principales componentes del biosensor SPR de Sensia. b) *(izda.)* Fotografías del biosensor y *(dcha.)* detalle de sus componentes (el módulo sensor, el diodo láser, el sistema de flujo y la electrónica). c) Fotografía de la ventana que da acceso al usuario al módulo sensor (cubeta de flujo, prisma y fotodetector montados sobre el goniómetro).

La adquisición de datos se adapta a los dos modos posibles de medida que permite el sistema: barrido de ángulo o a ángulo de incidencia fijo. El tratamiento de los datos se realiza utilizando el programa Origin® mediante la importación de ficheros de texto ASCII. Dado que en las medidas con sensores de SPR en tiempo real no interesa conocer el valor absoluto de la señal sino el cambio producido por la interacción molecular los cambios de señal registrados se van a expresar como variación de señal en unidades arbitrarias.

4.2.2 BIOSENSOR NANOMECÁNICO

Para medir el cambio de deflexión que sufre la micropalanca se ha desarrollado un sistema experimental de fabricación propia compuesto de una celda de flujo donde está inmersa la micropalanca y un sistema de control de flujo, así como un sistema de detección óptica, consistente en un diodo láser y un fotodetector.

La figura M2 muestra una foto/esquema del sistema experimental desarrollado donde la pieza mecánica que soporta la celda permite variar el ángulo de incidencia del haz láser para posicionarlo sobre el extremo libre de la micropalanca.

Todos los experimentos de medida de la deflexión se han realizado en medio líquido. Para ello se ha utilizado una celda de flujo comercial (Digital Instruments, Veeco), donde se aloja la micropalanca cuya parte superior es de vidrio y que se cierra al presionarla contra un cubre-vidrios mediante una junta de vitón. El volumen que encierra oscila entre 50 y 100 μl . Para evitar derivas térmicas se mantiene un flujo constante durante toda la medida mediante el uso de una bomba peristáltica (Gilson) a una velocidad de 0.3 $\mu\text{l/s}$. Por el mismo motivo para poder inyectar la solución de analitos sin necesidad de parar el flujo y evitar además la posible entrada de burbujas se utiliza una válvula de inyección (Sigma-Aldrich, modelo 5020) que permite rellenar un bucle externo con la solución deseada (200 μl) y posteriormente inyectarlo sin necesidad de detener el flujo. Debido a que inicialmente la deriva térmica es muy alta es necesario esperar el tiempo necesario hasta alcanzar un equilibrio térmico antes de realizar cada experimento (normalmente el tiempo de espera es de ~ 1 h).

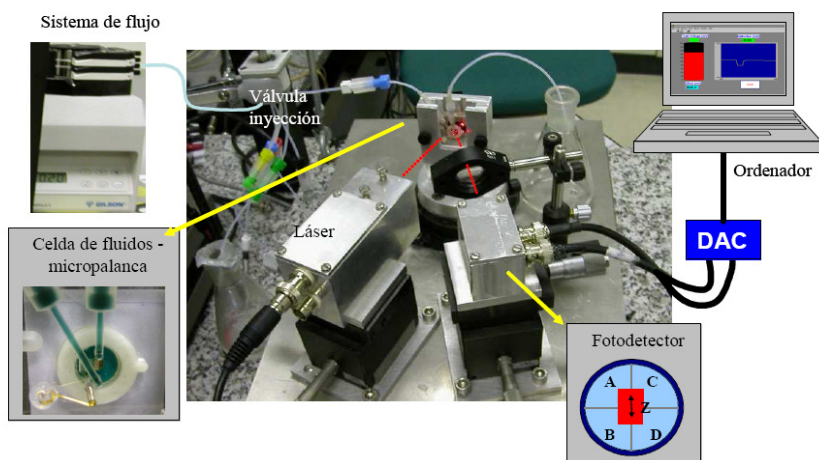


Figura M2. Esquema del sistema experimental empleado, basado en una única micropalanca. El sistema consta de un sistema de flujo, un sistema de detección óptica y un sistema de adquisición.

Para determinar el tiempo de llegada de la disolución a la celda así como el tiempo que la disolución permanece en ésta se ha utilizado una solución coloreada. Se ha elegido una velocidad de flujo de $0.3 \mu\text{l/s}$ ya que es la que permite que la muestra fluya por celda por espacio de 15 min.

Para realizar la detección óptica se ha utilizado un diodo láser de 3mW de potencia, con un rango de longitud de onda $\lambda = 630\text{-}670 \text{ nm}$. El haz reflejado de la micropalanca incide sobre un fotodetector de cuatro cuadrantes (modelo S4349, de Hamamatsu) colocado sobre una plataforma x-z que facilita el posicionamiento del haz en el centro del fotodetector. La posición del haz en el fotodetector se obtiene a partir de los fotovoltajes generados en cada cuadrante y que son proporcionales a la iluminación que reciben. El desplazamiento del haz en el fotodetector se obtiene sustrayendo a la suma de la señal medida en los cuadrantes superiores la suma de la señal obtenida en los cuadrantes inferiores (se trabaja como si fuera un fotodetector de dos cuadrantes), para a continuación convertir ambas señales de corriente en señales de voltaje mediante dos convertidores I-V (HMS Elektronik) que además las amplifican. Posteriormente la lectura de dicha señal se realiza mediante una tarjeta de conversión analógica a digital (DACo, de National Instruments) conectada a un ordenador personal que permite medir en tiempo real la deflexión de la micropalanca. Para corregir la dispersión del haz láser reflejado se ha colocado una lente convergente antes del fotodetector.

La elección del fotodetector se debe a su pequeña distancia entre cuadrantes (100 mm) y a su buen ancho de banda (20 MHz). El haz reflejado tiene un diámetro mayor que la distancia entre cuadrantes por lo que la resolución del sistema en la detección de la deflexión (del orden de 0.3 nm) está gobernada por el ruido de dicho sistema. La adquisición de las respuestas se controla por un software implementado en entorno Labview.

Las medidas experimentales llevadas a cabo con este sistema se han realizado utilizando micropalancas comerciales de nitruro de silicio típicamente utilizadas para AFM (Olympus, ORC8-PS-W), de 200 μm de longitud, 40 μm de ancho y 0.8 μm de espesor con una constante elástica k de 0.1 N/m.

Los valores de tensión superficial de cada deflexión obtenida experimentalmente se han calculado a partir de la ecuación de Stoney para un valor del módulo de Young y del coeficiente de Poisson de 1.75×10^{11} N/m y de 0.25, respectivamente.

Para garantizar la calidad de la superficie de oro de la micropalanca sobre la que se va a realizar la inmovilización (pureza del oro, espesor de la película y limpieza), se ha retirado el recubrimiento de oro con el que las micropalancas son suministradas comercialmente mediante inmersión en una solución de ácido nítrico y ácido clorhídrico (1:3). Una de las superficies de la micropalanca (la que no tiene punta) se vuelve a recubrir con 20 nm de oro mediante evaporación térmica. Con el fin de mejorar la adherencia de la capa de oro y evitar así que se desprenda al trabajar en medios líquidos, se ha depositado previamente una capa de 5 nm de cromo. Antes de cada medida la superficie de oro se limpia por inmersión de la micropalanca primero en acetona-etanol-agua durante 1 min. en cada una de ellas y seguidamente en una solución *piraña* (30% de H_2O_2 y 70% de H_2SO_4) durante unos segundos para eliminar cualquier resto orgánico. A continuación se sumerge en agua destilada y se seca con pistola de nitrógeno.

4.3 Técnicas ex-situ para la caracterización de la inmovilización e hibridación de ADN

4.3.1 FLUORESCENCIA

Se ha utilizado la técnica de fluorescencia como uno de los métodos de referencia para ayudar en la comprensión de determinados procesos que tienen lugar durante la inmovilización e hibridación del ADN y facilitar la optimización de los protocolos que se empleen finalmente en los dispositivos biosensores.

Se ha escogido el uso de la lectura fluorescente por su sencillez y sensibilidad y porque se puede disponer comercialmente de oligos marcados con marcadores fluorescentes durante la síntesis. Presenta además una buena

estabilidad para los procesos químicos que se van a llevar a cabo en este estudio. Los oligos de ADN han sido marcados con fluorocromo CY3 en el extremo 3' o 5' de manera que éste se encuentre siempre situado en el extremo más alejado de la superficie.

Para realizar los estudios de fluorescencia de forma que los resultados sean extrapolables al biosensor hemos mimetizado el medio y entorno de inmovilización del oligo usando portas de vidrio comerciales (EMF-Corporation, USA) sobre los que se ha evaporado la misma cantidad de oro que depositamos en los sensores: 5 nm de Cr y 45 nm de Au. Las muestras marcadas se depositan directamente con una pipeta (1 μ l) sobre la superficie de oro y la señal fluorescente se detecta por medio de un Scan Array 4000 de GSI Lumonics (Perkin Elmer, USA) facilitado por el Departamento de Inmunología y oncología del Centro Nacional de Biotecnología Madrid(CSIC). Este escaner usa una tecnología láser confocal para recoger la señal de interés y reducir de forma automática la señal de fondo para obtener una alta relación señal/ruido dando lugar a la obtención de resultados muy reproducibles. Cuenta con cinco tipos de láser que el usuario puede seleccionar cubriendo un rango de longitudes de onda de excitación desde 488 nm a 633 nm. Posee una resolución de 5 píxeles (Figura M3a).

El lector confocal de fluorescencia genera imágenes en una escala arbitraria de color asociada a la cantidad de fluorescencia donde la ausencia de fluorescencia se representa por el color negro mientras que la máxima fluorescencia, correspondiente a una señal saturada, se representa en blanco pasando por toda una gama de colores que se detalla en la escala de la Figura M3b.

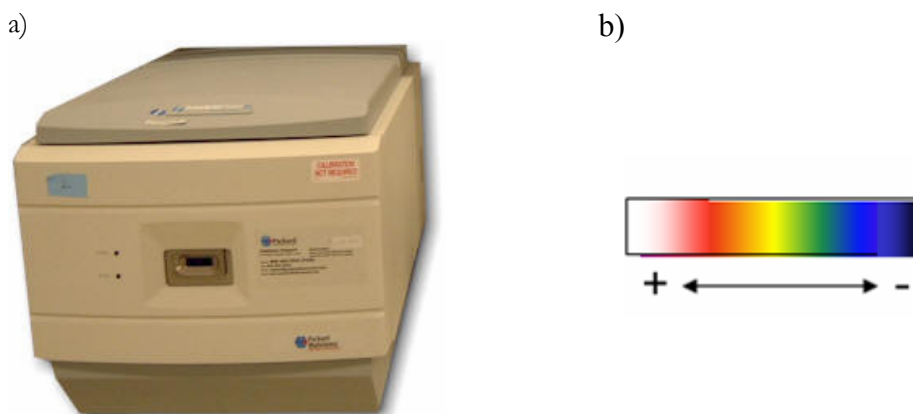


Figura M3. a) Imagen del ScanArray GSI Lumonics b) Escala de colores asociada con la señal de fluorescencia detectada proveída por el Scan Array.

4.3.2 MARCAJE RADIOACTIVO

La técnica de radiomarcaje, al igual que la fluorescencia, es una herramienta de fácil manejo y que permite una lectura directa con alta sensibilidad por lo que también ha sido empleada como técnica de referencia para determinados experimentos. Emplea el isótopo ^{32}P para marcar los oligos y poder visualizarlos. Presenta la ventaja de que la detección puede realizarse por medida directa de las desintegraciones por minuto de las muestras radiactivas presentes o por impresión de la radiactividad en una auto-radiografía. En nuestro caso el revelado de la información relativa a la inmovilización en soportes de oro se ha llevado a cabo por auto-radiografía.

Los oligos destinados a los experimentos de análisis de secuencias vinculadas al BRCA-1 fueron marcados en el extremo 5' antes de su uso por reacción de éstos con la enzima T4 polinucleotido kinasa (New England, Biolabs) en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (Amersham Biosciences), siendo eliminados los marcadores que no hayan reaccionado con las cadenas de ADN mediante filtrado de la solución a través de una columna de cromatografía (Microbio-spin P-30 Tris). El proceso de marcaje tiene una eficiencia del 10%

Para los experimentos destinados a estudiar el efecto del uso de un espaciador vertical en el oligo inmovilizado sobre la señal de hibridación los oligos complementarios fueron adquiridos de forma comercial portando el marcaje en el extremo 3', ya que el extremo 5' portaba un marcaje fluorescente con CY3.

4.3.3 ESPECTROSCOPIA FOTOELECTRÓNICA DE RAYOS X (XPS)

La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X, XPS ó ESCA (Espectroscopía Electrónica para Análisis Químico) es una técnica analítica de espectroscopía electrónica empleada para la caracterización de superficies. Es actualmente el método más ampliamente utilizado para este fin [235].

El análisis XPS de una superficie puede proporcionar información cualitativa y cuantitativa de todos los elementos presentes, excepto H y He, en concentraciones hasta el 0.1%, así como información detallada de la química, organización y morfología de la superficie con un error $< \pm 10 \%$; información acerca del entorno molecular: estado de oxidación, átomos enlazantes, orbitales moleculares, etc. o de variaciones laterales en la composición de la superficie e incluso permite estudios sobre superficies hidratadas (congeladas).

La tecnología XPS mide la energía de enlace relacionada con el electrón que se emite y se asocia siempre a enlaces de tipo iónico o covalente

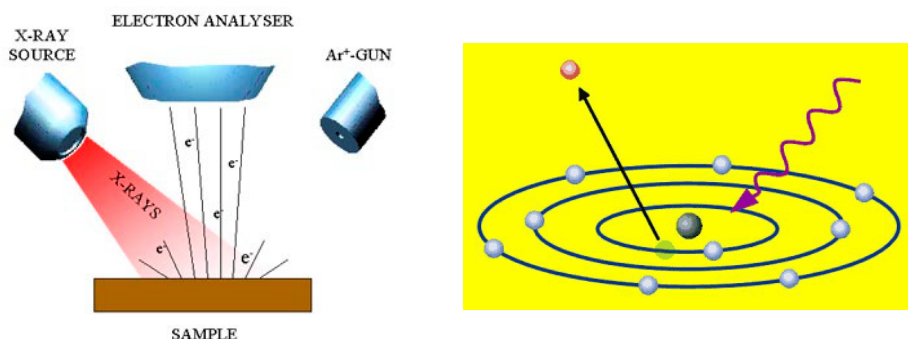


Figura M4 (Izquierda) Superficie irradiada con una fuente de fotones de alta energía que provoca la emisión de electrones. (Derecha) Principio de funcionamiento del XPS: El fotón imparte su energía a un electrón de un nivel electrónico interior, y este es emitido.

entre átomos. La energía de enlace de un electrón variará según el tipo de átomo (valor absoluto de su carga nuclear) y de los átomos que a él se unan (los cuales pueden alterar la distribución electrónica). Cuanto más interno es el electrón más fuerte será su enlace.

Los registros XPS aportan gran información tanto en el análisis de sistemas orgánicos como inorgánicos. Los análisis cuantitativos se realizan mediante estudio de la relación de áreas encerradas bajo cada pico para los diferentes elementos. Introduciendo los apropiados factores de corrección se puede determinar el porcentaje de cada elemento presente (siempre en los primeros 10 nm de la superficie y exceptuando H y He).

Es, por tanto, una técnica de gran interés para su uso en estudios de caracterización de los procesos de inmovilización del ADN en superficies y por este motivo se ha elegido como una técnica complementaria para nuestros estudios.

Los principales componentes de un instrumento XPS son el sistema de vacío, la fuente de rayos X, un analizador de energía del electrón y un sistema de datos (Figura M4). La parte central del equipo lo constituye la cámara principal de vacío donde se analiza la muestra. Los experimentos se deben realizar en condiciones de ultra-alto vacío debido a que los fotoelectrones han de viajar desde la muestra hasta el detector sin colisionar con ninguna partícula de fase gaseosa y a que la composición superficial de la muestra ha de permanecer invariable durante el experimento. Además, algunos componentes tales como la fuente de rayos X, requieren condiciones de vacío para mantener su operatividad.

Los experimentos de XPS se han llevado a cabo en el Instituto de Materiales de Madrid del CSIC. Se ha empleado una fuente de rayos X de Mg

K α ($h\nu=1253.6$ eV) manteniendo un ángulo entre el analizador semi-esférico (Specs-PHOIBOS100) y el plano de la superficie de 60° , a una presión de 1×10^{-10} mbar. Los espectros de barrido amplio han sido adquiridos con un paso de energía de fotón de 0,25 eV y un paso de energía de 40 eV, mientras que los barridos finos para el análisis específico del azufre y el oro se han adquirido con un paso de energía de fotón de 0,1 eV y un paso de energía de 15 eV. Durante las medidas experimentales se han acumulado entre 1000 y 2300 barridos de los niveles internos 2p del azufre con el fin de aumentar la relación señal-ruido del espectro.

En cuanto al tratamiento de los datos obtenidos antes de llevar a cabo el análisis se han sustraído las contribuciones correspondientes a las líneas satélites de los rayos X de MgK α . Además se ha sustraído de los espectros la señal de fondo. La curva resultante se ha normalizado respecto del máximo tras la sustracción del fondo. Asimismo, la escala de la energía de enlace se ha calibrado con respecto del pico del oro 4f $7/2$ a 83.8 eV. Los ajustes de los componentes de los picos se ha llevado a cabo usando un ajuste de los dobletes de tipo Gaussiano-Lorentziano (GL) y considerando un salto spin-orbital estándar de 1.2 eV y una relación 1:2 de S 2p $1/2$ / S 2p $3/2$. Por la identificación de estos dobletes empleando la energía de la componente S 2p $3/2$ el resultado es la aparición de dos componentes, la componente S1 a 161.9 ± 0.5 eV y la componente S2 163.4 ± 0.5 eV, cuyas proporciones relativas resultan cruciales en el estudio de fenómenos de quimi y fisi-adsorción del azufre en oro.

El ancho total a la mitad del máximo del pico del espectro (FWHM: Full Width at Half Maximum) de todas las componentes se ha tratado para que adopte el mismo valor durante el proceso de ajuste de los espectros.

En las medidas en las que se ha empleado MCH (mercaptohexanol) para obtener mayor conocimiento de los procesos de inmovilización para diferentes tipos de grupos mercapto, el protocolo ha sido medir las muestras de ADN inmovilizadas en ultra-alto vacío, después extraerlas de la cámara para añadir el MCH y reintroducirlas en el sistema de ultra-alto vacío para medirlas nuevamente y constatar los cambios introducidos por la adición del MCH.

4.4 Protocolos de inmovilización e hibridación.

Los oligonucleótidos comerciales están siempre en estado liofilizado. En el momento de su uso se prepara una disolución madre 1mM en agua y para cada experimento se procede al alicuotado de las mismas en las condiciones de concentración y tampón que correspondan. El tampón usado para los experimentos de inmovilización (salvo que se analicen otras condiciones) es el fosfato-50 mM - NaCl 0.5 M.

En los casos en los que se lleve a cabo la inmovilización de oligos con funcionalización SH, para asegurar que el grupo se mantenga en este estado y evitar procesos de dimerización, éstos son tratados previamente a la inmovilización con el agente reductor Dithiotreitol (DTT) o reactivo de Cleland (en una relación de 50 mg de DTT por cada 1mg de ADN) durante 20 min. Tras la reacción se centrifuga y se recoge el sobrenadante.

4.4.1 BIOSENSOR SPR

El proceso de inmovilización de ADN se ha realizado de modo que éste sea lo primero que llegue al sensor. Para ello, con el sistema previamente vacío de líquido a una velocidad de 8 $\mu\text{L}/\text{min}$, se inyectaron en el sistema una disolución 300 μL de oligo suspendido en el tampón de inmovilización en concentración 1 μM (salvo excepciones). De esta forma el ADN es lo primero que llega a la superficie por lo que la señal de inmovilización no es medida. Tras la inmovilización se mide la curva de reflectividad frente al ángulo de resonancia y se elige el ángulo de trabajo según se detalla en el apartado 4.3.1.

Para el desarrollo del formato multianalito la inmovilización se ha llevado a cabo de manera ex-situ en lugar de en flujo por depósito de una gota que cubra el sustrato y que contiene la mezcla de las diferentes secuencias durante un período de 3h, limpiando seguidamente el sustrato con agua destilada y secándolo suavemente con pistola de nitrógeno.

El tratamiento con MCH se lleva a cabo sobre la monocapa de ADN ya inmovilizada empleando 300 μL de una disolución 1 mM que se inyecta a una velocidad de 12 $\mu\text{L}/\text{min}$.

La hibridación se lleva a cabo por inyección de 300 μL del oligo complementario en una concentración variable según el experimento disuelto en el tampón de hibridación que será, salvo excepciones, el tampón fosfato (PB) 50 mM - NaCl 1 M a una velocidad de 12 $\mu\text{L}/\text{min}$.

En el caso de la detección de secuencias relativas al BRCA1 se han realizado ensayos de hibridación en citrato salino sódico, SSC1X (0.15 M NaCl, 0.015 M Citrato sódico) y para el formato multianalito el tampón de hibridación es una solución de SSC 5X (0.75 M NaCl, 0.075 M Citrato sódico) con un porcentaje de formamida del 5%.

La regeneración del proceso de hibridación se lleva a cabo empleando NaOH 0,2 M o HCl 5 mM según el experimento excepto para las medidas en formato multianalito donde se ha empleado una solución de formamida al 35% en agua.

4.4.2 BIOSENSORES NANOMECÁNICOS

La inmovilización del ADN se lleva a cabo de manera análoga al biosensor SPR, siendo la disolución con ADN lo primero que llega al sensor. Una vez que la muestra sale del sensor, se hace circular H_2O durante algunos minutos para limpiar la superficie del exceso de oligos que no han inmovilizado y se reenfoca la punta de la micropalanca para obtener la máxima señal. Seguidamente se hace fluir tampón de inmovilización hasta que el sistema se estabilice y pierda cualquier señal de deriva térmica, típica de estos dispositivos.

En los casos en los que se monitorice la señal de inmovilización del ADN antes de inyectarlo se hace circular por el sistema el mismo tampón de inmovilización en el que va disuelto hasta que desaparece la señal de deriva térmica y se mantiene estable.

Para la inmovilización de ADN se inyectan en el sistema 200 μ l de oligo en el tampón de inmovilización en concentraciones de 1-4 μ M. El tiempo de llegada a la celda es de unos 7 min.

El tratamiento con MCH sobre la monocapa de ADN se realiza inyectando un volumen de 200 μ l del mismo en concentración 1 mM en el tampón de inmovilización.

La hibridación se lleva a cabo por inyección de 200 μ l del oligo complementario en una concentración 1 μ M disuelto en el tampón de hibridación que será, salvo excepciones, el tampón fosfato 50 mM - NaCl 1 M.

4.4.3 TÉCNICAS EX-SITU

Dado que la cadena de ADN destinada a la inmovilización ha sido modificada con un grupo mercapto la inmovilización de dichas cadenas a cualquier superficie de oro se realiza directamente mediante la química de las monocapas auto-ensambladas sin necesidad de pasos intermedios. Los oligos de la concentración elegida son depositados directamente con pipeta (0.5 μ l) sobre la superficie y guardados en cámara húmeda para prevenir efectos de evaporación del proceso (en condiciones de oscuridad para experimentos de fluorescencia) durante un período que varía desde unos minutos hasta varias horas para comprobar la efectividad de la inmovilización. A continuación son lavados 3 veces/5 min. en H_2O y se secan con pistola de nitrógeno.

En los casos en que sea necesario un post-tratamiento con MCH, éste tendrá lugar por inmersión del sustrato o por depósito de una gota de MCH 1 mM preparado en el mismo buffer de inmovilización durante un período de tiempo no superior a 1 h. y que puede variar según el experimento llevado a cabo.

Finalmente se procederá al lavado de la superficie con abundante agua y secado nuevamente con pistola de nitrógeno.

Para la hibridación se deposita un volumen de varios microlitros conteniendo el oligo complementario preparado en el tampón de hibridación (tampón fosfato 50 mM - NaCl 1 M) sobre la misma zona donde se llevó a cabo la inmovilización. La reacción tiene lugar en cámara húmeda, y oscura si es preciso, durante 90 min. a temperatura ambiente.



RESULTADOS

5.1 Caracterización de los procesos de inmovilización e hibridación en biosensores SPR y nanomecánicos

La hibridación de ADN cuando se trabaja con oligos inmovilizados está más impedida por la falta de movilidad y de libertad de conformación espacial que tienen los oligos anclados en la superficie.

Para conseguir maximizar la detección de ADN durante la hibridación es preciso realizar una exhaustiva caracterización de los procesos de inmovilización previos a la detección y de la detección misma en diferentes condiciones de inmovilización previa.

Por ello se ha llevado a cabo un exhaustivo estudio con los biosensores de SPR y nanomecánicos de forma paralela para elegir las condiciones más adecuadas. Al mismo tiempo se han realizado algunos experimentos complementarios con técnicas de caracterización ex-situ (fluorescencia, radio-marcaje y XPS) para comprobar determinados resultados.

5.1.1 CONDICIONES DE INMOVILIZACIÓN

El primer aspecto que se ha considerado en los protocolos de inmovilización ha sido el de optimizar lo principal de este proceso con el objetivo de obtener una monocapa de ADN bien organizada y estructurada, en la que los fenómenos de fisisorción sean minimizados. Esto permitiría que la hibridación alcance una alta sensibilidad y además sea reproducible. Para ello, resulta clave elegir el tipo de funcionalización adecuada con la que modificar el ADN. Como se detalla en Materiales y métodos existen diferentes modificaciones que pueden ser empleadas para la inmovilización de ADN en superficies de oro. Para estos experimentos se han considerado tres tipos de funcionalización mercapto con la que modificar el ADN:

- i) **sulfidrido** en la que la secuencia de ADN esta modificada con un grupo SH: *DNA-SH*
- ii) **disulfido-dimérica** en la que dos secuencias de ADN modificadas con el grupo -SH se encuentran en la forma dimerizada, unidas entre sí por un puente disulfuro: *DNA-SS-DNA*

iii) **disulfido-DMTO** en la que la secuencia de ADN se encuentra unida, a través de un grupo disulfuro a un grupo dimetoxitritilo (DMTO) que lo protege frente a la oxidación.

Se han empleado oligos con las tres modificaciones anteriores en el extremo 5' de la secuencia de 12 bases y en los casos en los que se ha necesitado usar algún marcaje éste ha sido incluido en el extremo 3' de la secuencia. Con el fin de simplificar la nomenclatura, en adelante los denominaremos en función del tipo de modificación como: DNA-SH, DNA-SS-DMTO y DNA-S-S-DNA

Aunque para la inmovilización el hecho de que las secuencias de ADN presenten un átomo de azufre es una condición suficiente para que se unan de forma covalente a la superficie del oro, sin embargo el hecho de tener el azufre en la forma oxidada (disulfido), o en la forma reducida (sulfidril), puede afectar al grado de quimiadsorción, al grado de recubrimiento o a la forma en que se estructura y ordena la monocapa de ADN.

Nuestro interés en este estudio de inmovilización se centra, más que en conseguir un alto recubrimiento, en que éste sea debido a ADN *correctamente inmovilizado mediante enlace covalente* con el oro, es decir, quimiadsorbido. Para determinar el grado de quimiadsorción asociado a cada tipo de funcionalización necesitamos introducir algún parámetro que nos permita identificar la proporción de moléculas en superficie que están quimiadsorbidas frente a las que se encuentran fisiadsorbidas. Esto puede conseguirse mediante el uso de mercaptohexanol (MCH). Esta molécula contiene una cadena alifática de seis carbonos terminada en un grupo alcohol y que porta en el extremo opuesto un grupo sulfidril, que le permite unirse al oro mediante el enlace S-Au.

El MCH, cuando se añade sobre una monocapa de ADN previamente inmovilizada, tiene la capacidad de eliminar de la superficie las moléculas que no están unidas de forma covalente, ocupando éste su lugar en la monocapa. Además, debido a su pequeño tamaño se incorpora en los

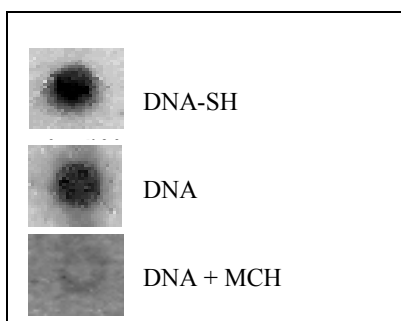


Figura R1 Comparativa de la señal de radiomarcage de un ADN modificado con un grupo SH y la misma secuencia sin modificar, fisiadsorbido sobre oro. Se muestra el efecto del MCH sobre éste último.

huecos disponibles entre cadenas de ADN próximas [129]. Este hecho lo refleja la Imagen de la Figura R1 donde se puede observar el efecto del MCH sobre una capa de ADN no modificado fisisorbido sobre oro. Asimismo se puede observar como la señal de fisisorción de ADN en oro es casi del mismo orden ($2 \cdot 10^{12}$ molec/cm²) que la de ADN funcionalizada con el grupo SH ($3 \cdot 10^{12}$ molec/cm²) indicando que los procesos de fisisorción del ADN en oro no son despreciables.

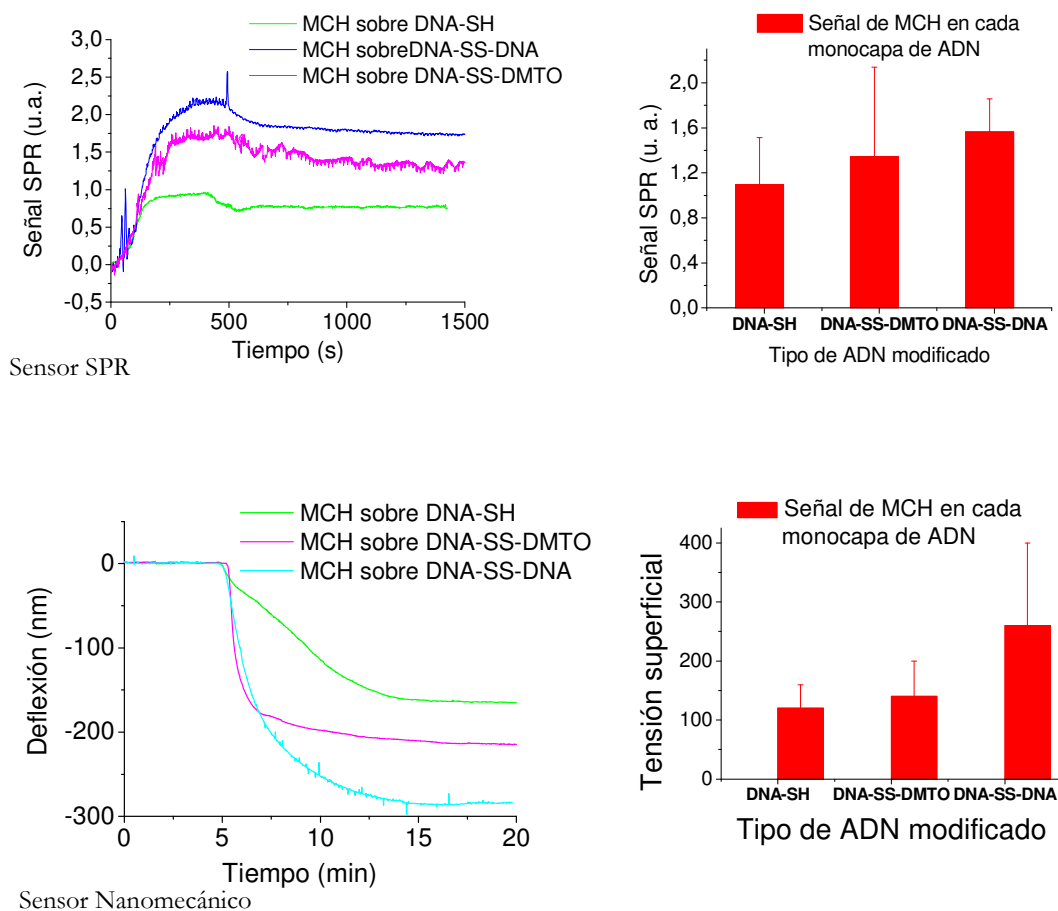


Figura R2. Efecto del MCH sobre los diferentes tipos de ADN modificado con un grupo mercapto monitorizado por SPR (arriba) y biosensores nanomecánicos (debajo). A la derecha se muestra la estadística de dicho efecto en ambos biosensores.

Para la caracterización del efecto del MCH sobre las monocapas de ADN se ha evaluado la señal de inmovilización del MCH 1 mM cuando se añade sobre una monocapa de ADN 1 μM modificada con cada una de las tres funcionalizaciones mercapto, tanto en biosensores SPR como nanomecánicos. Los resultados se muestran respectivamente en la Figura R2a y R2b. La concentración de ADN ha sido seleccionada a partir de experimentos de fluorescencia donde se han empleado diferentes concentraciones (0,5-10 μM) de DNA-SH (R3a). La concentración 1 μM es, de todas, la que da una señal elevada sin llegar a saturación.

De las diferentes señales generadas por el MCH se constata que ésta es mayor sobre la monocapa de DNA-SS-DNA. La menor incorporación de MCH se observa para la monocapa de DNA-SH que parece ser la que mejores propiedades presenta en cuanto a quimiadsorción.

Para obtener más datos acerca del recubrimiento que genera cada tipo de ADN modificado así como el efecto del MCH en dicho recubrimiento para las diferentes monocapas se ha observado por fluorescencia y radiomarcaje la señal del ADN inmovilizado antes y después de dicho tratamiento (Figura R3).

En las Figuras R3b y R3c puede observarse como cada tipo de ADN funcionalizado presenta, desde la misma inmovilización, señales de distinta intensidad indicando que el tipo de funcionalización es clave para generar diferentes grados de recubrimiento. Según los datos de fluorescencia, antes de añadir el MCH, las funcionalizaciones -SH y SS-DMTO son las que generan mayor señal de ADN inmovilizado, mientras que el DNA-SS-DNA, sería el que peor eficiencia de inmovilización muestra. Por otra parte el MCH revela resultados similares a los obtenidos por biosensores SPR y nanomecánicos. La incorporación del MCH conlleva una bajada de la señal fluorescente en todas las especies, excepto para el caso del DNA-SS-DNA, cuya fluorescencia se ve aumentada de forma sorprendente. Este efecto fluorescente puede ser explicado por la presencia de fenómenos de extinción de la fluorescencia, más conocidos por la denominación en inglés, “quenching” (*fenómeno físico por el cual la emisión fluorescente es inhibida cuando el fluoróforo se encuentra situado próximo a esta superficie, de modo que los fenómenos de relajación en el fluoróforo tienen lugar por procesos no radiativos. Ver apartado 6.1.1 de discusión*), que indicarían la existencia de diferentes orientaciones de cada tipo de ADN respecto de la superficie de oro.

Los datos de recubrimiento proporcionados por medio de conteo por centelleo en los experimentos de radiomarcaje (Figura R3c) muestran valores de densidad de moléculas del orden de 10^{12} molec/cm² antes de incorporar el MCH y en torno a 10^{11} - 10^{12} tras su incorporación.

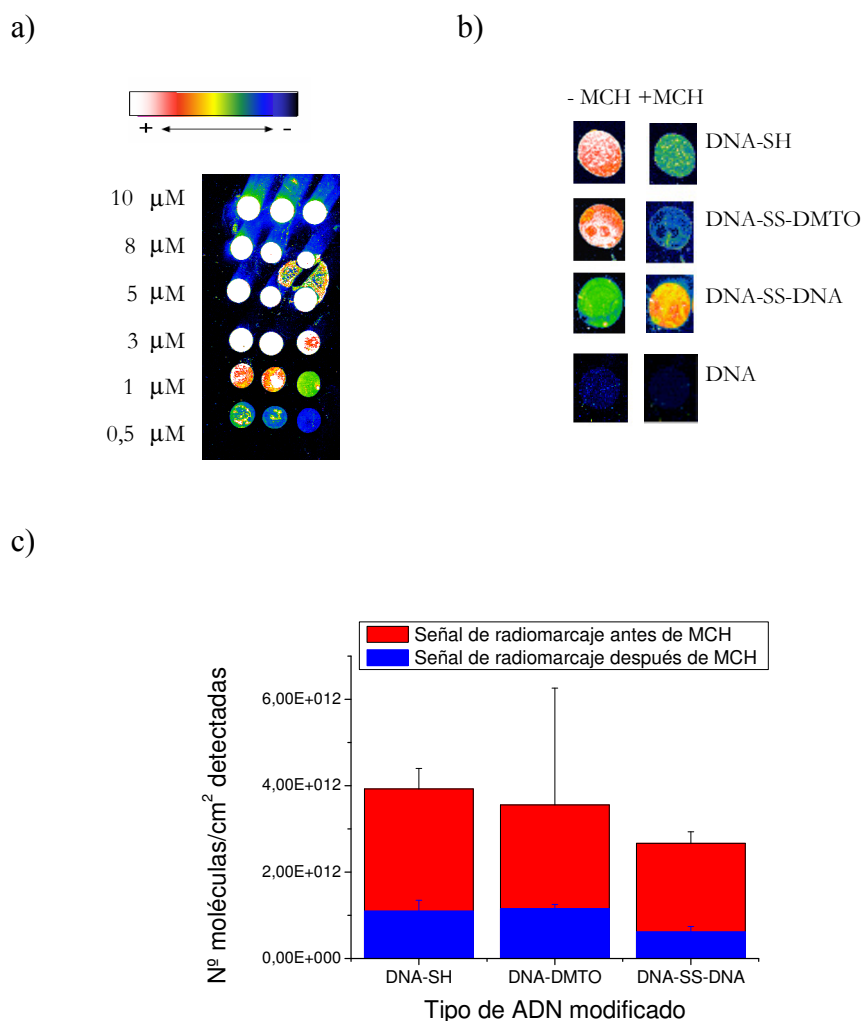


Figura R3 (a) Señal de fluorescencia de la inmovilización de DNA-SH a diferentes concentraciones (0,5-10 μM) y (b) de esta misma secuencia a concentración 1 μM antes y después de tratarse con MCH. Se muestra también (c) los datos de recubrimiento obtenidos por radio-marcaje antes y después de añadir MCH para los tres tipos de ADN.

La post-inmovilización del MCH implica en todos los casos un descenso del orden del 60% respecto de la señal inicial tras el tratamiento con MCH. A pesar de que las medidas presentan un error elevado, se puede apreciar un mayor recubrimiento para el DNA-SH, seguido de DNA-SS-DMTO y el DNA-SS-DNA que fue quien mostró los resultados más bajos.

Un estudio más exhaustivo por medio de espectroscopía de rayos X (XPS) nos ha permitido estimar con exactitud que porcentaje de las

moléculas están correctamente quimiadsorbidas en cada tipo de monocapa. En este caso se han llevado a cabo los procesos de inmovilización durante 5 min. y 15 h. con el fin de analizar las características de la monocapa en los primeros instantes de su formación y tras un período en el que se considera que se ha alcanzado el máximo recubrimiento. En estas condiciones se ha analizado de forma cuantitativa el espectro tanto del Au 4f como de los niveles energéticos internos 2p correspondientes al azufre (Figura R4). Con estos datos se ha calculado la relación de las señales S/Au para cuantificar el porcentaje de átomos de azufre presentes en superficie con relación al oro para cada una de las especies y este dato se ha traducido en términos de recubrimiento molecular (número de moléculas/cm²).

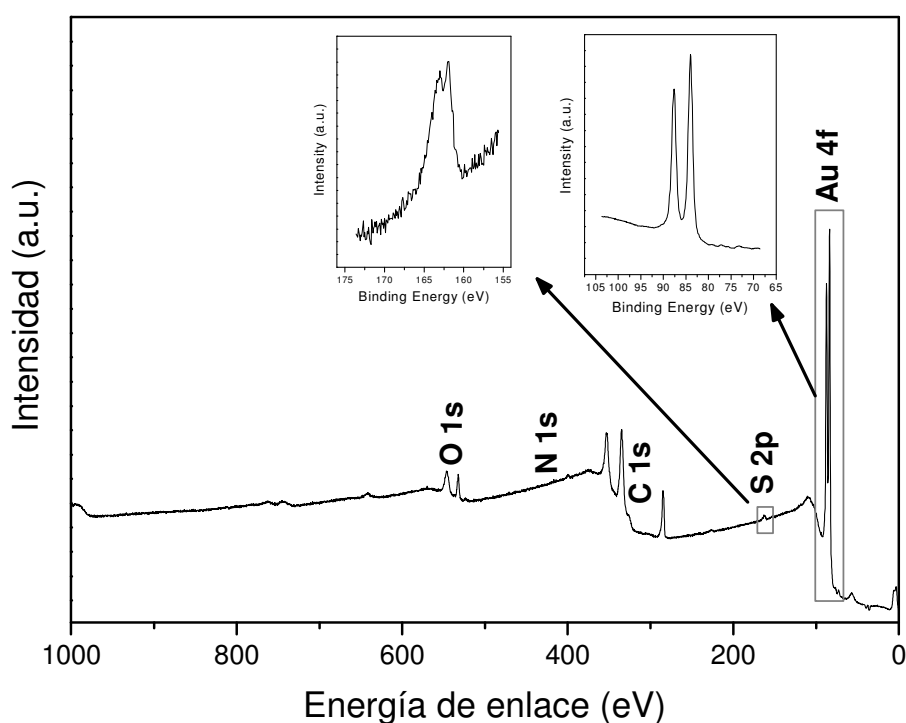


Figura R4. Espectro de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X. Se muestran los picos de emisión de los componentes más representativos de la muestra de ADN inmovilizada en oro. Sobre este espectro se ha llevado a cabo el análisis de forma cuantitativa de los picos tanto del Au 4f como de los niveles energéticos internos 2p correspondientes al azufre.

Los datos, representados en la Tabla R1, muestran porcentajes de azufre y de recubrimiento para el DNA-SH, superiores frente a los de las especies DNA-SS-DMTO y DNA-SS-DNA a ambos tiempos de inmovilización, aunque la diferencia es muy superior para la condición de 15

h. De forma sorprendente, el recubrimiento en las especies DNA-disulfido, no sólo no aumenta con el tiempo de inmovilización, si no que se constata una ligera disminución indicando la presencia de algún tipo de fenómeno de desorción.

Tabla R1. Porcentajes de recubrimiento para DNA-SH, DNA-SS-DMTO y DNA-SS-DNA a tiempos de inmovilización de 5 min. y 15 h.

Tipo de ADN	Recubrimiento			
	5 min.		15 h.	
	% S	Densidad de moléculas/ cm ²	% S	Densidad de moléculas/ cm ²
DNA-SH	8%	9.9x10 ¹³	18%	2.1x10 ¹⁴
DNA-SS-DMTO	5%	5.6x10 ¹³	4%	4.2x10 ¹³
DNA-SS-DNA	6%	6.9 10 ¹³	2%	1.8x10 ¹³

Asimismo para determinar el grado de quimi/fisiadsorción de cada tipo de ADN se ha realizado i) un análisis de las componentes involucradas en el pico del espectro correspondiente a los niveles energéticos internos 2p del azufre y ii) un análisis del efecto de la molécula de mercaptohexanol (MCH) sobre las monocapas de ADN inmovilizadas.

El estudio de las componentes involucradas en el pico de azufre, se ha realizado por medio de un ajuste del pico de azufre, tal y como se detalla en la sección 4.4.3 de materiales y métodos, que ha permitido elucidar dos tipos de contribuciones, denominadas S1 y S2:

- La componente S1 se atribuye al azufre quimiadsorbido.
- La componente S2 se atribuye a una combinación de factores, entre los cuales están las especies no enlazadas de forma covalente como el enlace disulfido-Au, el azufre fisiadsorbido sobre el oro y nuevas especies de azufre que puedan aparecer como consecuencia de un daño por radiación ionizante.

Para nuestros propósitos, el interés de los experimentos se centra en la componente S1, cuyo valor nos indicará la capacidad de quimiadsorción de la especie en cuestión.

Los resultados de ambas componentes a los dos tiempos de inmovilización se muestran en la Figura R5. Los valores de S1 respecto del total de señal, S1+S2, para el DNA-SH, DNA-SS-DMTO y el DNA-SS-DNA fueron respectivamente para la condición de 5 min, 79%, 54% y 72%; y 81%, 64% y 51% para la de 15 h. Se observa que con el paso del tiempo hay una reorganización de la monocapa, de modo que a los 5min la modificación SH y la disulfido-dimérica de la misma especie muestran valores similares, siendo el disulfido portador del grupo DMTO el que presenta un valor más bajo; al aumentar el tiempo de inmovilización a 15 h.

se genera un perfil en el que la modificación SH presenta el mayor valor de quimiadsorción, seguido del disulfido portador del grupo DMTO y, en último lugar, la forma disulfido-dimérica del ADN. Es interesante observar que mientras las formas SH y la disulfido-DMTO aumentan la señal de S1 con el tiempo de inmovilización, la molécula DNA-SS-DNA tras 15 h. de inmovilización reduce de forma notable la contribución asociada a la quimiadsorción pasando de 72% a 51%, lo cual indica que en la muestra sucede algún tipo de fenómeno de desorción de las moléculas quimiadsorbidas con el tiempo.

Por otra parte se ha analizado el efecto que el MCH ejerce sobre las monocapas de ADN con los tres tipos de funcionalización mercapto previamente inmovilizadas durante 5 min. Los resultados de los experimentos antes y después del tratamiento con MCH se muestran en la Figura R6. Los experimentos muestran un aumento considerable en el porcentaje de azufre comparado con el porcentaje inicial de azufre del ADN inmovilizado, indicando una importante incorporación del MCH en los tres tipos de monocapa (Tabla R2).

El mayor valor asociado a la incorporación de MCH se halló para el disulfido correspondiente a la forma dimérica del ADN y el más bajo, para la molécula DNA-SH. Sin embargo, a pesar de haber ligeras diferencias, estos son muy próximos entre sí, indicando que el recubrimiento total encontrado tras la incorporación del MCH es el máximo posible, del orden de $2.0\text{-}2.5 \times 10^{14}$ molec/cm².

Tras la adición del MCH se espera que cuanto mayor sea la señal del pico de azufre, peor será la calidad de la monocapa en términos de quimiadsorción. Esto se debe a que la incorporación del MCH en estas monocapas redundará en un aumento del recubrimiento neto como consecuencia de un aumento del porcentaje de átomos de azufre. Esta incorporación tendrá lugar en mayor medida cuando la monocapa ofrezca mayor número de huecos y/o mayor grado de moléculas fisisorbidas. Para observar este efecto es preciso calcular la relación entre el recubrimiento reflejado por el pico de azufre antes y después del tratamiento con MCH. Los resultados muestran una eficiencia de inmovilización muy superior para el DNA-SH, con un 47% del pico de azufre debido al DNA-SH. Las dos modificaciones disulfido dan lugar a valores muy próximos, mostrando una eficiencia del 23% y 26% para el DNA-SS-DMTO y el DNA-SS-DNA, respectivamente.

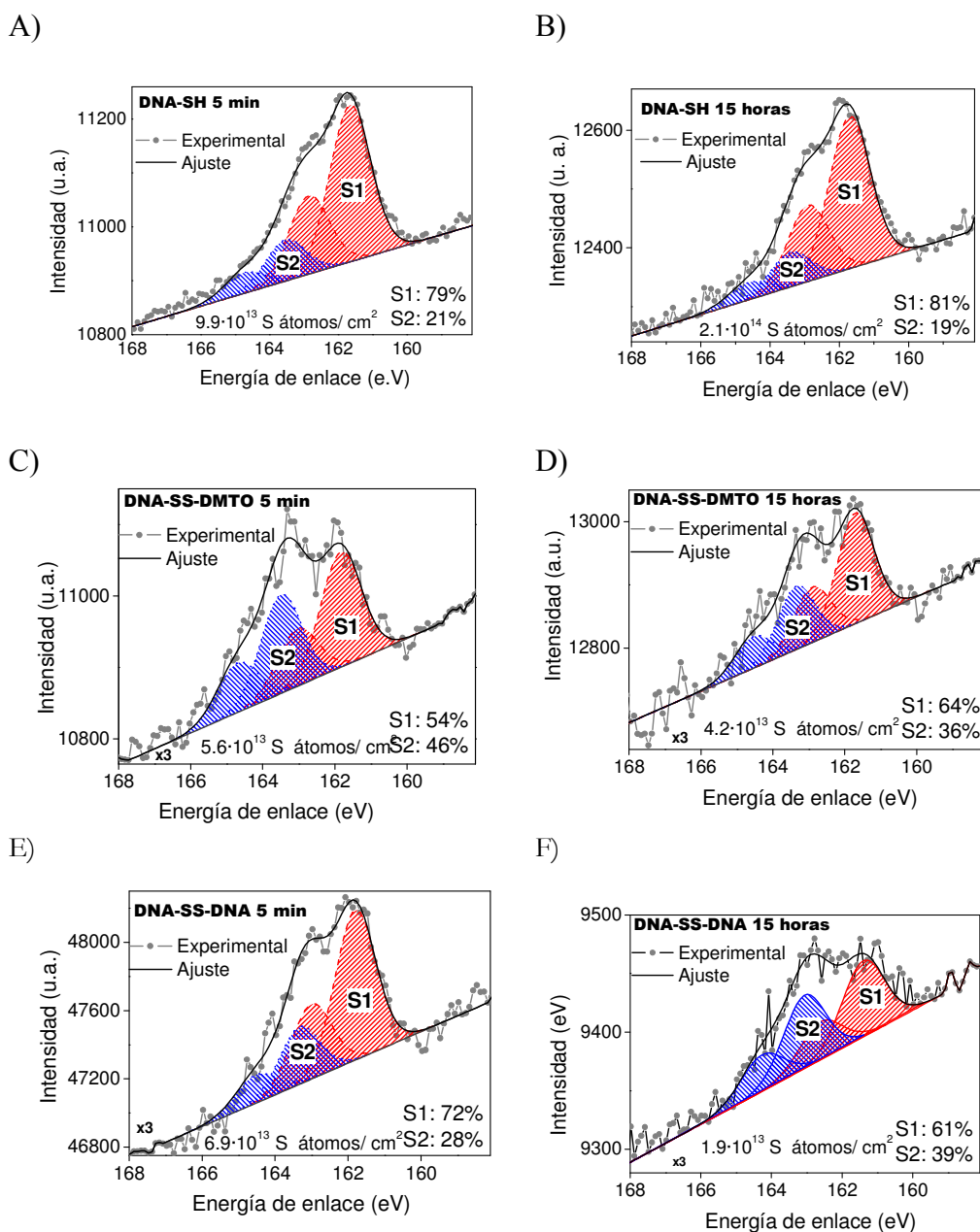


Figura R5. Espectros correspondientes al pico del S 2p para los tres tipos de ADN modificado donde se muestra la contribución de cada componente del pico del espectro correspondiente al análisis de los niveles energéticos internos del S 2p tras 5 minutos y 15 h de inmovilización. El porcentaje de la contribución de la componente S1 asociada a la quimiadsorción del azufre se muestra en rojo mientras que la debida a la componente S2 asociada a otros procesos se muestra en azul.

Según estos datos la molécula de ADN funcionalizada con el grupo SH es la mejor quimiadsorbida, al presentar una menor incorporación de dicha molécula en la monocapa y una mayor eficiencia de quimiadsorción.

Finalmente y dado que los principios físicos relacionados con la respuesta de tensión superficial no están bien esclarecidos hemos querido

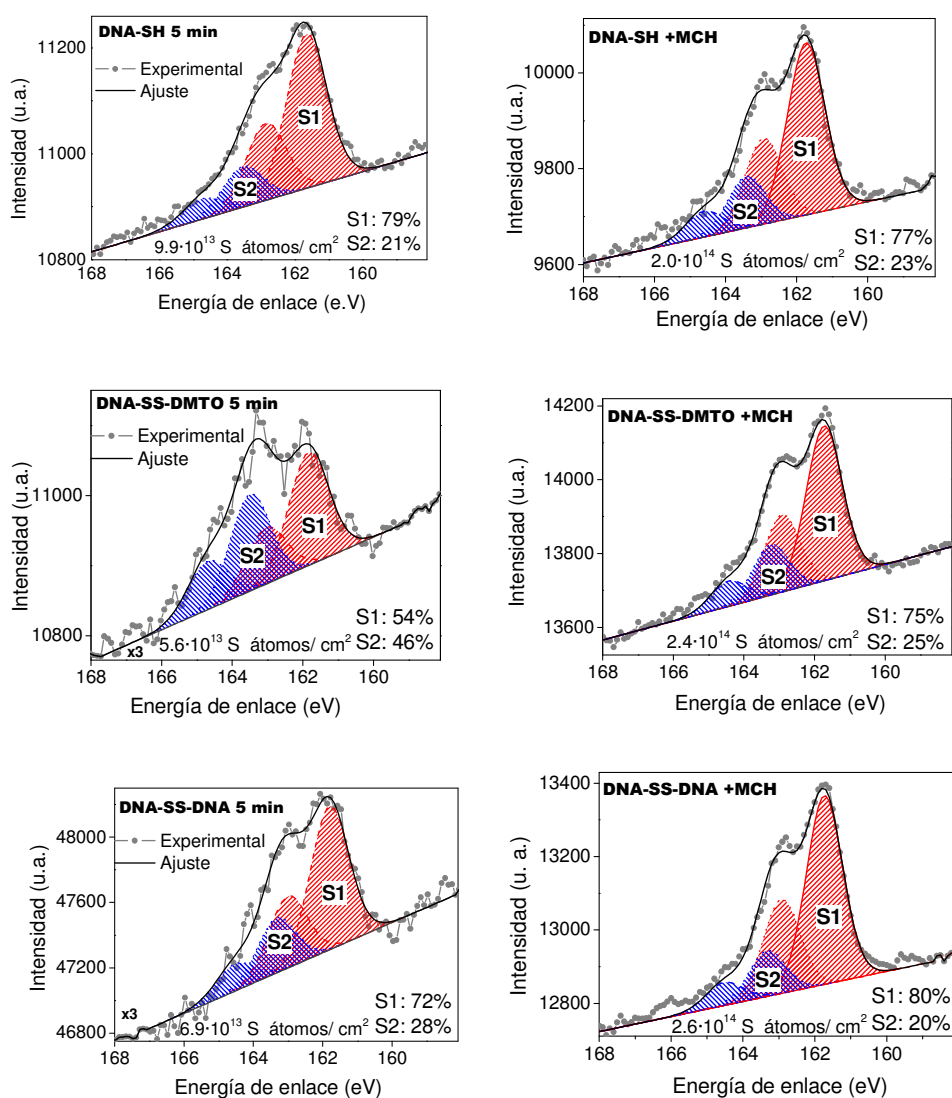


Figura R6. Espectros correspondientes al pico del S 2p para los tres tipos de ADN antes (izda.) y después del tratamiento con MCH (dcha.).

Tabla R2. Efecto en el recubrimiento del MCH sobre las monocapas de ADN con los tres tipos de funcionalización mercapto previamente inmovilizadas durante 5min.

Especie	Recubrimiento		Recubrimiento sin MCH Recubrimiento con MCH %
	% S	Densidad de moléculas/ cm ²	
DNA-SH (1)	8%	9.9×10^{13}	
DNA-SS-DMTO (2)	5%	5.6×10^{13}	
DNA-SS-DNA (3)	6%	6.9×10^{13}	
MCH sobre (1)	17%	2.0×10^{14}	49%
MCH sobre (2)	20%	2.4×10^{14}	23%
MCH sobre (3)	22%	2.6×10^{14}	26%
MCH			

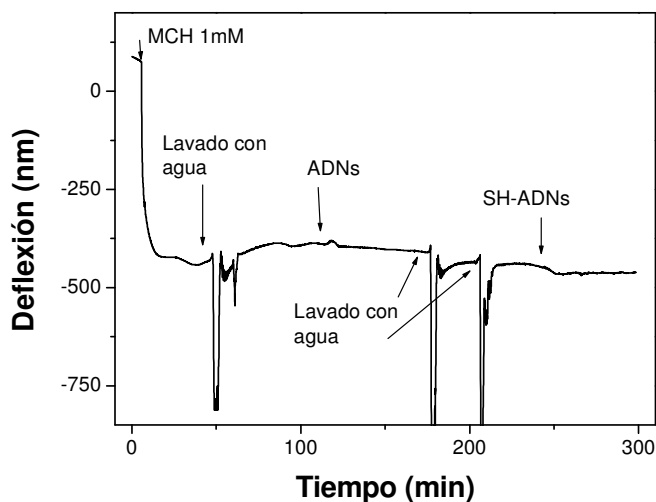


Figura R7. Adsorción de ADN no modificado y uno modificado con un grupo SH sobre una superficie de una micropalanca previamente funcionalizada con MCH.

estudiar la respuesta de las micropalancas frente a los fenómenos de quimiadsorción.

Para ello se ha analizado: i) el efecto de la fisiadsorción en el lado de nitruro de la micropalanca y ii) el efecto que los fenómenos de quimi/fisiadsorción ejercen durante la inmovilización de las diferentes moléculas de ADN modificado

En los biosensores nanomecánicos, en los que un lado de la micropalanca es de nitruro de silicio y el otro se encuentra recubierto de oro

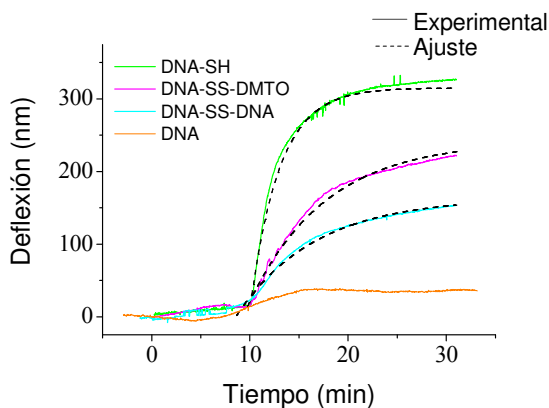
es de vital importancia descartar cualquier contribución de fisiadsorción del ADN en el lado del nitruro de silicio sobre la respuesta global de la micropalanca durante los procesos de inmovilización e hibridación. Para llevar a cabo dicho estudio, se ha procedido a inmovilizar MCH sobre la superficie no modificada del oro para que el ADN no pueda unirse a esta superficie y posteriormente monitorizar la respuesta de la micropalanca cuando se añade el ADN modificado con SH y sin modificar. El resultado se muestra en la Figura R7. De la misma se constata que, tanto el ADN portador de un grupo mercapto como el no modificado apenas generan señal de deflexión en la micropalanca, indicando que la señal neta de deflexión medida durante la inmovilización del ADN sobre el oro se debe exclusivamente a los procesos de interacción del ADN con el oro sin que tengan lugar otros procesos análogos en el lado del nitruro de silicio.

Para estudiar el efecto que los fenómenos de quimi/fisiadsorción ejercen durante la inmovilización de las diferentes moléculas de ADN modificadas se ha evaluado la inmovilización de cada uno de los ADN modificados así como de uno sin modificar. La Figura R8a muestra un ejemplo de curvas de inmovilización para los cuatro casos.

Los valores medios de tensión superficial para cada uno de los tres tipos de ADN modificado (σ) son de 210 ± 60 mN/m para el DNA-SH, 110 ± 20 mN/m para el DNA-SS-DMTO y 70 ± 30 mN/m para el DNA-SS-DNA (Figura R8b), respectivamente. Por otra parte, el resultado de la deflexión correspondiente al ADN no modificado con grupo mercapto apenas da señal en comparación con el resto de especies portadoras de la modificación mercapto. Dado que los experimentos de radio-marcaje mostraban que los efectos de fisiadsorción en oro no son despreciables este resultado indica que la fisiadsorción de moléculas no es capaz de generar una tensión superficial suficientemente en comparación con la señal debida a la unión del azufre con el oro.

Al ser la deflexión de las micropalancas inertes antes los procesos de fisiadsorción los valores de deflexión reflejan únicamente la magnitud de los procesos de quimiadsorción durante la inmovilización. Por este motivo es de gran interés realizar un ajuste de las curvas de inmovilización a un modelo teórico que permita extraer conclusiones acerca de la cinética de inmovilización de cada tipo de ADN funcionalizado.

A



B

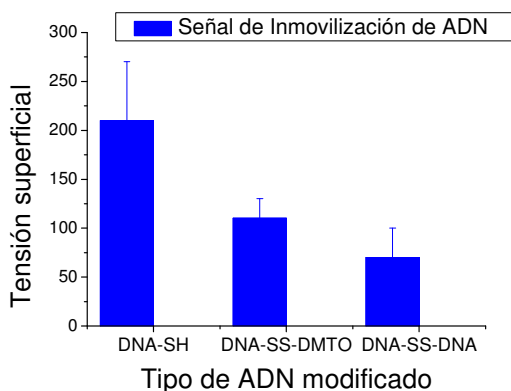


Figura R8. (a) Curvas representativas y (b) estadística de inmovilización de ADN en biosensores nanomecánicos.

El análisis de la evolución cinética de la inmovilización se muestra en la Figura R8a. Para este estudio se ha llevado cabo un ajuste siguiendo el modelo de adsorción isotérmico de Langmuir. Según este modelo, la velocidad de recubrimiento es proporcional al número de sitios vacantes disponibles en la superficie y queda definido por la ecuación $d\theta/dt = \kappa(1-\theta)$, donde θ representa el recubrimiento y κ , la velocidad con que tiene lugar dicho recubrimiento. Esta ecuación diferencial queda satisfecha para $\theta \sim 1 - e^{-\kappa t}$. El ajuste lo llevamos a cabo asumiendo que la señal obtenida es debida al recubrimiento por quimiadsorción. Como se puede observar en la Figura R8a, existe una buena concordancia entre el ajuste del modelo teórico elegido y la curva experimental, sugiriendo que el fenómeno de generación de tensión superficial es proporcional al número de moléculas quimiadsorbidas en la superficie de la micropalanca.

Los resultados de la cinética muestran unos valores de velocidad de adsorción de $k=0.31\pm0.06 \text{ min}^{-1}$ para la especie DNA-SH, superior al de las especies disulfido, que son muy similares entre si, con velocidades de $k=0.19 \pm 0.05 \text{ min}^{-1}$ y $k=0.20 \pm 0.04 \text{ min}^{-1}$, respectivamente.

5.1.2 CONDICIONES DE HIBRIDACIÓN

La figura R9 muestra una medida en tiempo real de la hibridación de ADN 12 mer sobre una monocapa de DNA-SH 12 mer en concentración 1 μM en un biosensor SPR. La inmovilización se lleva a cabo en flujo pero no se monitoriza siendo el ADN lo primero que llega a la celda. Tras la inmovilización se ha elegido el ángulo óptimo a partir de la curva de resonancia y se ha procedido a realizar la hibridación. La señal es regenerada posteriormente lavando con agua desionizada y NaOH 0,2 M.

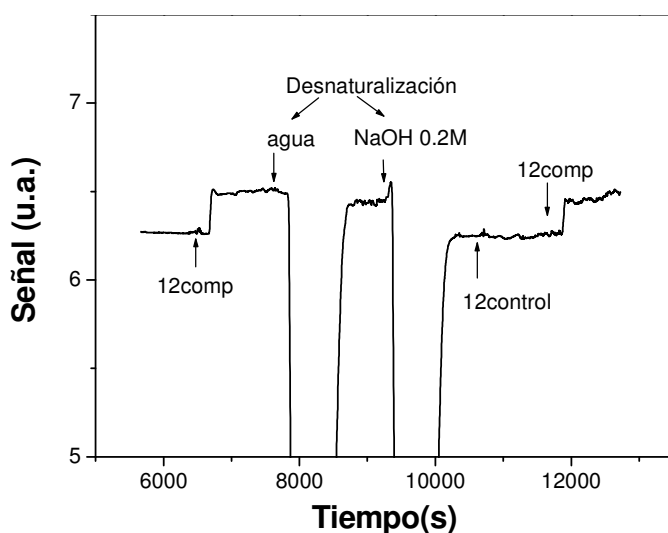


Figura R9. Hibridación y regeneración de la superficie de ADN. Se muestra la diferencia en respuestas para secuencias complementarias y control.

Tras la regeneración se inyecta un oligo no complementario y no se obtiene ninguna respuesta de hibridación, por lo que a continuación se inyecta de nuevo el complementario que sí es capaz de originar una respuesta. La señal de hibridación es, similar en magnitud a la señal

equivalente antes de regenerar, indicando que este proceso regenerativo permite deshibridar sin dañar la monocapa inmovilizada.

La reproducibilidad de las respuestas de hibridación ha permitido realizar un estudio de la señal de hibridación en función de la concentración de ADN complementario. Este estudio permite además estudiar la cinética de la interacción entre cadenas complementarias. El análisis cinético se ha realizado utilizando un ajuste al modelo de la isoterma de Langmuir cuando se ha alcanzado el equilibrio, asumiendo que el cambio de señal es proporcional al recubrimiento, que es la relación entre las moléculas inmovilizadas y el total de sitios disponibles en la superficie:

$$S = a \frac{K \cdot C}{(1 + K \cdot C)}$$

donde **S** es la señal medida, **K** es la constante de afinidad o de equilibrio, **C** es la concentración de complementario en disolución y **a** es la constante de proporcionalidad.

Tras el ajuste (Figura R10) se obtiene una constante de equilibrio $K=1.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. El valor de la constante de afinidad depende del número de enlaces G-C que existan, de la longitud de la cadena y del tampón utilizado. De la figura se puede observar que para esta longitud de oligos el límite de detección es de 100 nM.

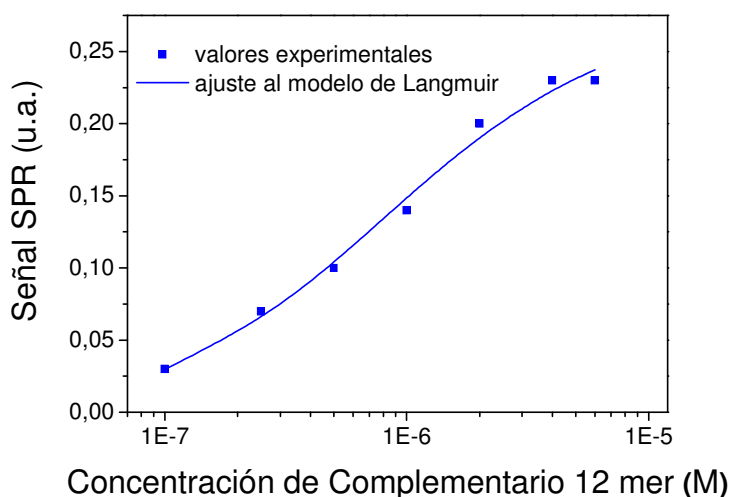


Figura R10. Representación de los valores de señal obtenidos por SPR en función de la concentración de ADN complementario. Se muestra también la curva del ajuste de los valores experimentales con el modelo de Langmuir (en rojo).

A continuación se ha estudiado la respuesta de hibridación en biosensores nanomecánicos, del mismo modo que se ha realizado con los de SPR y utilizando la misma concentración de oligo complementario y control (0.5 μM) (Figura R11). Las micropalancas han sido previamente activadas con DNA-SH 12 mer en concentración 1 μM . Como se aprecia en la Figura R10 la señal de hibridación es poco reproducible y no siempre es apreciable. Por otra parte, ambas respuestas, del complementario y el control son muy semejantes, por lo que resulta imposible diferenciarlas.

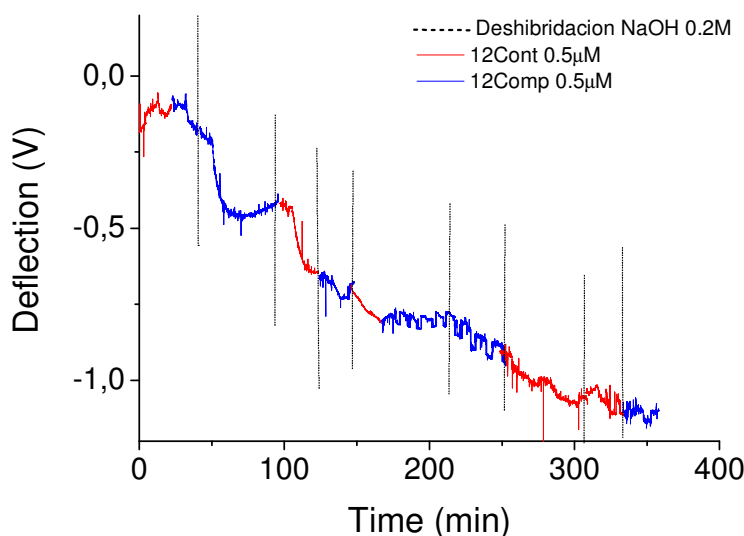


Figura R11. Deflexión debida a la inyección de una disolución de secuencias complementarias y controles 0,5 μM en una micropalanca funcionalizada con DNA-SH 1 μM .

5.1.3 OPTIMIZACIÓN DE LA DETECCIÓN POR MEJORA DE LA ACCESIBILIDAD

Cuando se obtiene un alto grado de empaquetamiento en la monocapa inmoviliza pesar de tener un gran número de moléculas susceptibles de participar en la hibridación muy pocas de ellas resultarán accesibles al complementario.

El complementario deberá en ese caso vencer el fuerte impedimento estérico que supone introducirse en una monocapa tan compacta. En el caso opuesto, para recubrimientos bajos muchos de los oligos pueden estar

tumbados sobre la superficie en una geometría desfavorable para la hibridación. El caso óptimo sería aquél en el que todas las moléculas inmovilizadas tuvieran la capacidad de hibridar por estar separadas entre ellas a una distancia suficiente para permitir el acceso del complementario minimizando los fenómenos de fisidorsorción. Por otra parte, la accesibilidad vertical del complementario también debe contemplarse y a que la accesibilidad puede verse mejorada si se consigue alejar respecto de la superficie la región destinada a la hibridación en la secuencia inmovilizada. Esto se puede llevar a cabo mediante el uso de una secuencia espaciadora de n nucleótidos entre el grupo mercapto y el primer nucleótido partcipe de la hibridación (Figura R12).

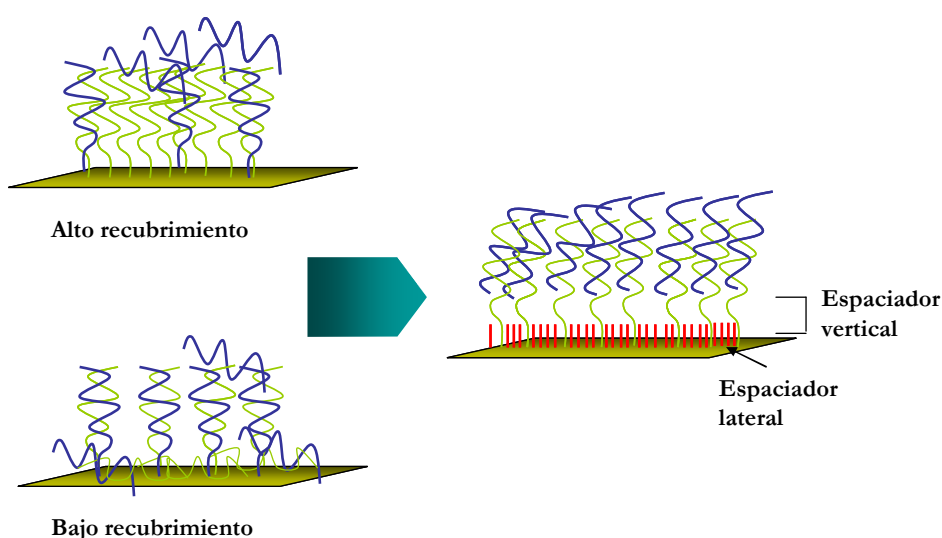


Figura R12. Esquema de las estrategias empleadas para mejorar la accesibilidad de la secuencia complementaria

Con el fin de mejorar la calidad de señales de hibridación en ambos dispositivos se ha llevado a cabo un análisis de diferentes condiciones que pueden contribuir a mejorar la eficiencia de la hibridación al mejorar la accesibilidad de la secuencia complementaria a la monocapa.

En primer lugar hemos estudiado como afecta a la señal de hibridación la concentración de ADN empleada durante la inmovilización. Este estudio permite conocer qué grado de empaquetamiento permite una máxima accesibilidad. La Figura R13 muestra la señal de hibridación para diferentes concentraciones de ADN inmovilizado y misma concentración de complementario por SPR ($0,5 \mu\text{M}$).

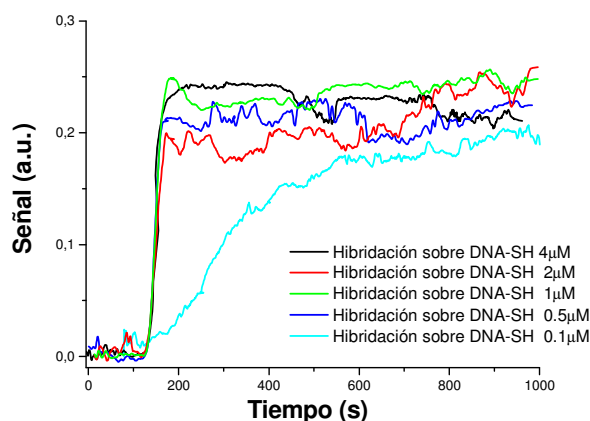


Figura R13. Comparativa de la señal de hibridación para diferentes concentraciones de DNA-SH inmovilizadas por SPR.

Los resultados de hibridación muestran una disminución de la velocidad de reacción al disminuir la concentración de ADN inmovilizado. Sin embargo para una misma concentración de oligonucleótidos complementarios se alcanza una señal similar aunque la cinética sea diferente. Esto se debe a que todas las superficies están igualmente recubiertas para concentraciones $\geq 0.5 \mu\text{M}$ y por tanto el porcentaje de moléculas que hibridan es el mismo, mientras que para concentraciones menores, el recubrimiento no es total y por tanto la cantidad de cadenas que hibridan es también algo inferior.

En biosensores nanomecánicos las variaciones en la concentración de inmovilizado no supone ninguna mejora en la señal de hibridación respecto de la condición anterior.

Se ha estudiado también el efecto que tiene sobre la señal de hibridación la introducción de un espaciador lateral, empleando una monocapa de oligo inmovilizado $1 \mu\text{M}$. Como espaciador lateral se ha escogido el MCH, cuya eficacia en la mejora de la hibridación por este papel espaciador ha sido demostrada en los trabajos del grupo de Tarlov y colaboradores [129-131].

En primer lugar se ha procedido a inmovilizar diferentes relaciones (μM) de ADN:MCH, siendo elegidas las proporciones 1:0, 1:0.2, 1:0.4, 1:0.6, 1:0.8 y 1:1. El resultado se muestra en la Figura R14a. De la misma se puede extraer que el MCH ejerce un notable efecto espaciador mejorando la accesibilidad, siendo la mejor relación la de 1:0.6 μM .

Se ha probado también el efecto del espaciador mediante un protocolo alternativo llevando a cabo primero la inmovilización del ADN y, después, el tratamiento con MCH 1 mM, tal y como propone el grupo de Tarlov en sus experimentos de caracterización [129-131]. La Figura R14b muestra una comparativa de la señal de hibridación con y sin dicho tratamiento por fluorescencia mediante este último protocolo. Como se puede apreciar el efecto del MCH generado por ambas metodologías es equivalente. Por ello y dado que resulta más sencillo hacer un post-tratamiento que optimizar en cada caso la relación ADN/MCH necesaria para cada secuencia de ADN, en adelante siempre que se considere la adición de MCH, este tratamiento se llevará a cabo con posterioridad a la inmovilización del ADN.

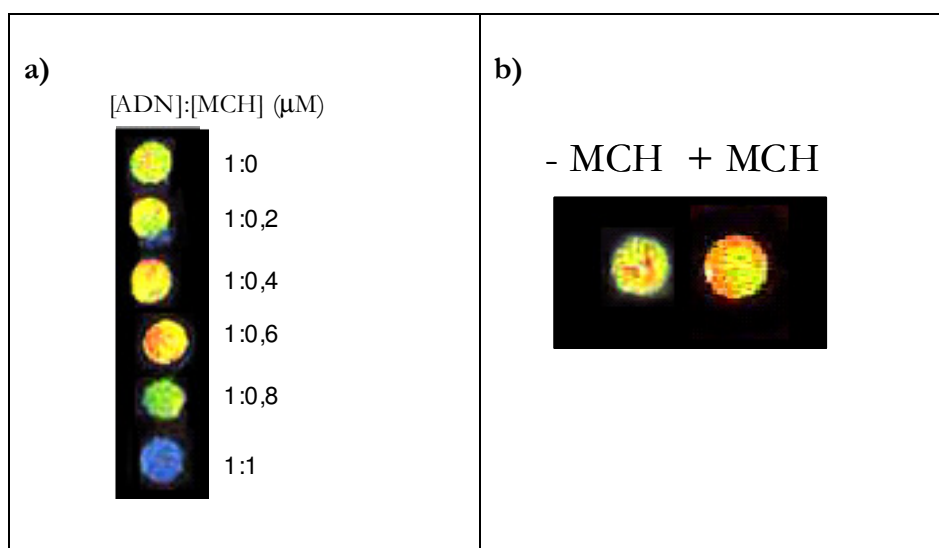


Figura R14 (a) Señal de hibridación tras inmovilizar diferentes relaciones (μM) de ADN:MCH **(b)** Comparativa de la señal de hibridación antes y después del tratamiento post-inmovilización con MCH por fluorescencia

Se ha realizado una comparativa con SPR de la señal de hibridación considerando una monocapa de oligo inmovilizado con y sin MCH. Los resultados se muestran en la Figura R15 donde se puede constatar un notable aumento en la señal de hibridación como consecuencia del uso del espaciador lateral.

En biosensores nanomecánicos, sin embargo, esta estrategia no ha supuesto una mejora en la señal de hibridación (Figura R16). En esta figura se muestra una estadística en la que se ha realizado una normalización de los resultados de hibridación respecto de su señal de inmovilización para una misma micropalanca, con el fin de sustraer cualquier efecto debido a variaciones en las propiedades mecánicas de la micropalanca. Así se ha

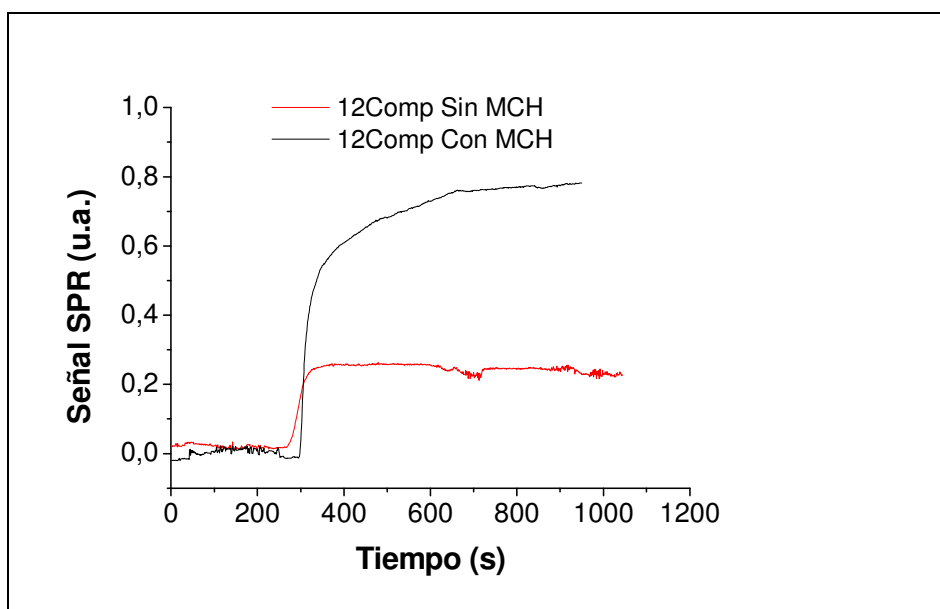


Figura R15. Comparativa con SPR de la señal de hibridación considerando una monocapa de oligo inmovilizado DNA-SH con y sin MCH.

representado la relación en % de la señal de deflexión de la hibridación/inmovilización.

En promedio las señales de hibridación en monocapas sin MCH eran superiores que en monocapas tratadas con MCH, aunque tras numerosos experimentos en ningún caso se han encontrado diferencias significativas entre secuencias complementarias y controles para ninguna de las condiciones analizadas.

Finalmente se ha estudiado la accesibilidad del complementario desde el punto de vista vertical. Para ello hemos considerado longitudes de secuencia espaciadora de timinas desde $n=0$ hasta $n=20$, seguidas de la secuencia que se desea hibridar, en nuestro caso, la misma secuencia de 12 nucleótidos de experimentos anteriores en concentración $1\text{ }\mu\text{M}$.

El experimento se ha realizado de forma simultánea por fluorescencia y marcaje radiactivo utilizando para la hibridación el oligonucleótido complementario 12 mer $10\text{ }\mu\text{M}$, al que se le ha realizado un doble marcaje, fluorescente y radiactivo.

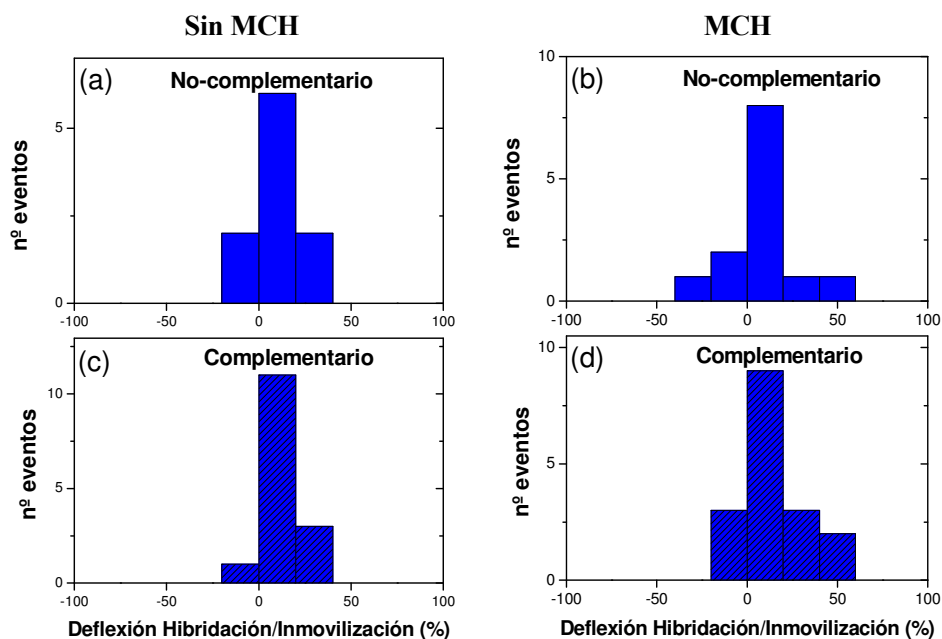


Figura R16. Estadística de la señal de deflexión debida a secuencias complementarias, respecto a la señal de inmovilización, con y sin tratamiento de MCH.

Los resultados se muestran en la Figura R17. Se puede observar que existe una secuencia espaciadora óptima de 15 nucleótidos que favorece notablemente la hibridación. Esta secuencia de 15 nucleótidos quedará fijada en adelante para el resto de experimentos. Es importante señalar que los resultados son equivalentes por ambas técnicas, sin que se puedan apreciar fenómenos de extinción de la fluorescencia en ningún caso. La importancia de facilitar la accesibilidad desde un punto de vista vertical se constata también por SPR en la Figura R18. Se muestra una señal de hibridación comparativa en monocapas con y sin el espaciador de 15 timinas, para una misma secuencia de complementario 0,5 μM .

Como se aprecia en la figura, la presencia del espaciador vertical aumenta de forma considerable la eficiencia de la hibridación. Sin embargo en biosensores nanomecánicos, una vez más, esta estrategia no consigue generar una señal de hibridación apreciable (Figura R19).

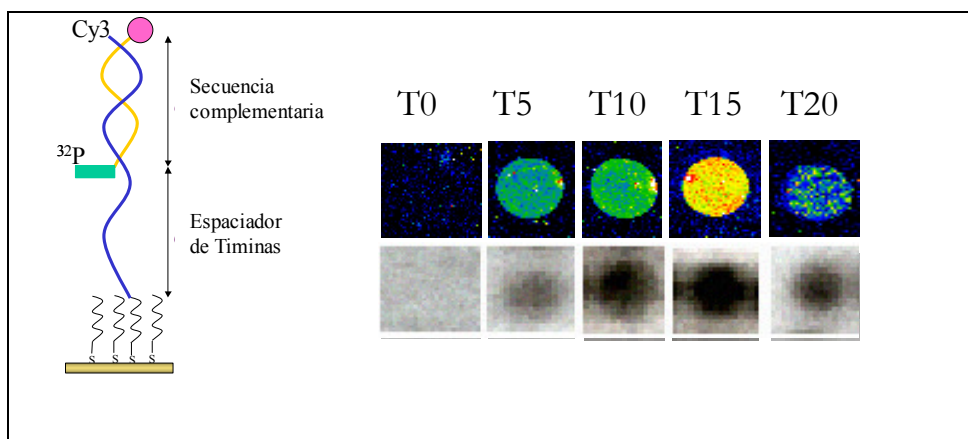


Figura R17. Optimización de la accesibilidad vertical de la secuencia complementaria estudiada por fluorescencia (imágenes superiores) y marcaje radiactivo (imágenes inferiores). A la izquierda se indica el esquema seguido durante el experimento. Se puede observar la existencia de una distancia óptima que mejora sustancialmente la hibridación.

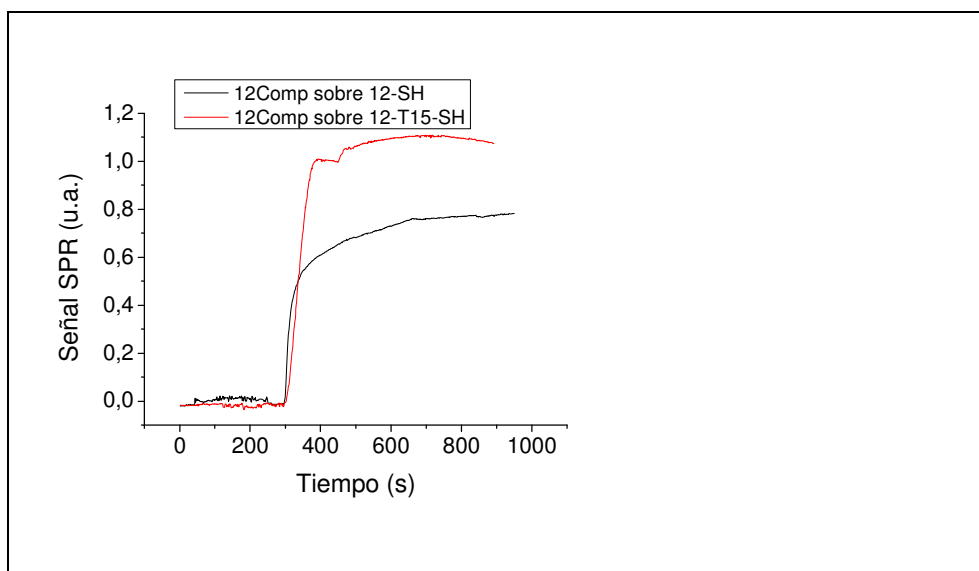


Figura R18. Señal de hibridación en SPR comparativa en monocapas con y sin el espaciador de 15 timinas, para una misma secuencia de complementario $0,5 \mu\text{M}$

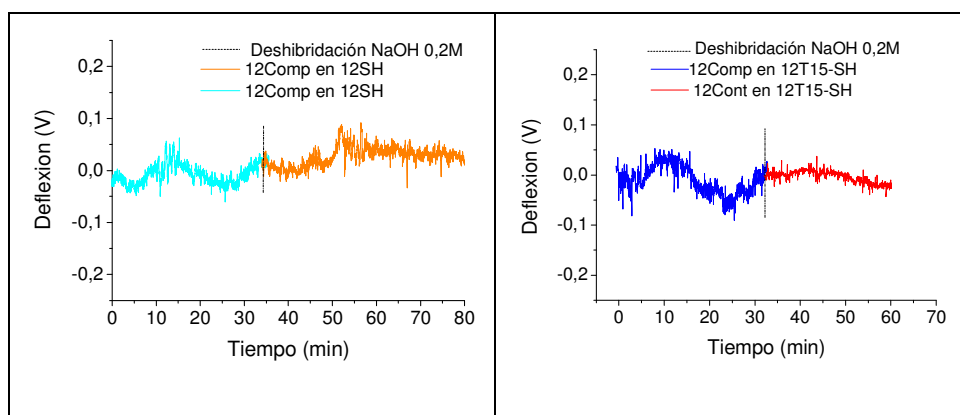


Figura R19. Señales de hibridación en biosensores nanomecánicos con y sin el uso del espaciador lateral MCH.

Dada la constatada incapacidad de los biosensores nanomecánicos para detectar la hibridación de ADN, se ha elegido el biosensor SPR como la plataforma biosensora idónea para el desarrollo de un protocolo que permita detectar mutaciones.

5.2 Condiciones para la detección de mutaciones en SPR

Antes de proceder a la búsqueda de condiciones que permitan identificar mutaciones hemos estudiado la hibridación en estos sensores empleando oligos de ADN de 25 bases de longitud. Los oligos inmovilizados portan la cadena espaciadora vertical de 15 timinas.

Las medidas de la curva de calibrado se han hecho a partir de una misma monocapa de ADN y evaluando la hibridación siempre por triplicado para cada concentración. La regeneración entre medidas de hibridación consecutivas se ha llevado a cabo con HCl 5 mM (en lugar de con NaOH 0,2 M) porque esta solución generaba resultados más reproducibles y duraderos en número de ciclos. La regeneración con HCl 5 mM ha permitido reutilizar la misma monocapa de ADN durante al menos 60 ciclos sin que pierda sus propiedades y sin apreciarse una pérdida en la magnitud de la señal de hibridación.

En la Figura R20 se puede observar como al ser estos oligos más largos, y de mayor masa, el sistema SPR tiene mayor sensibilidad para su detección, alcanzando un límite de detección de 10 nM.

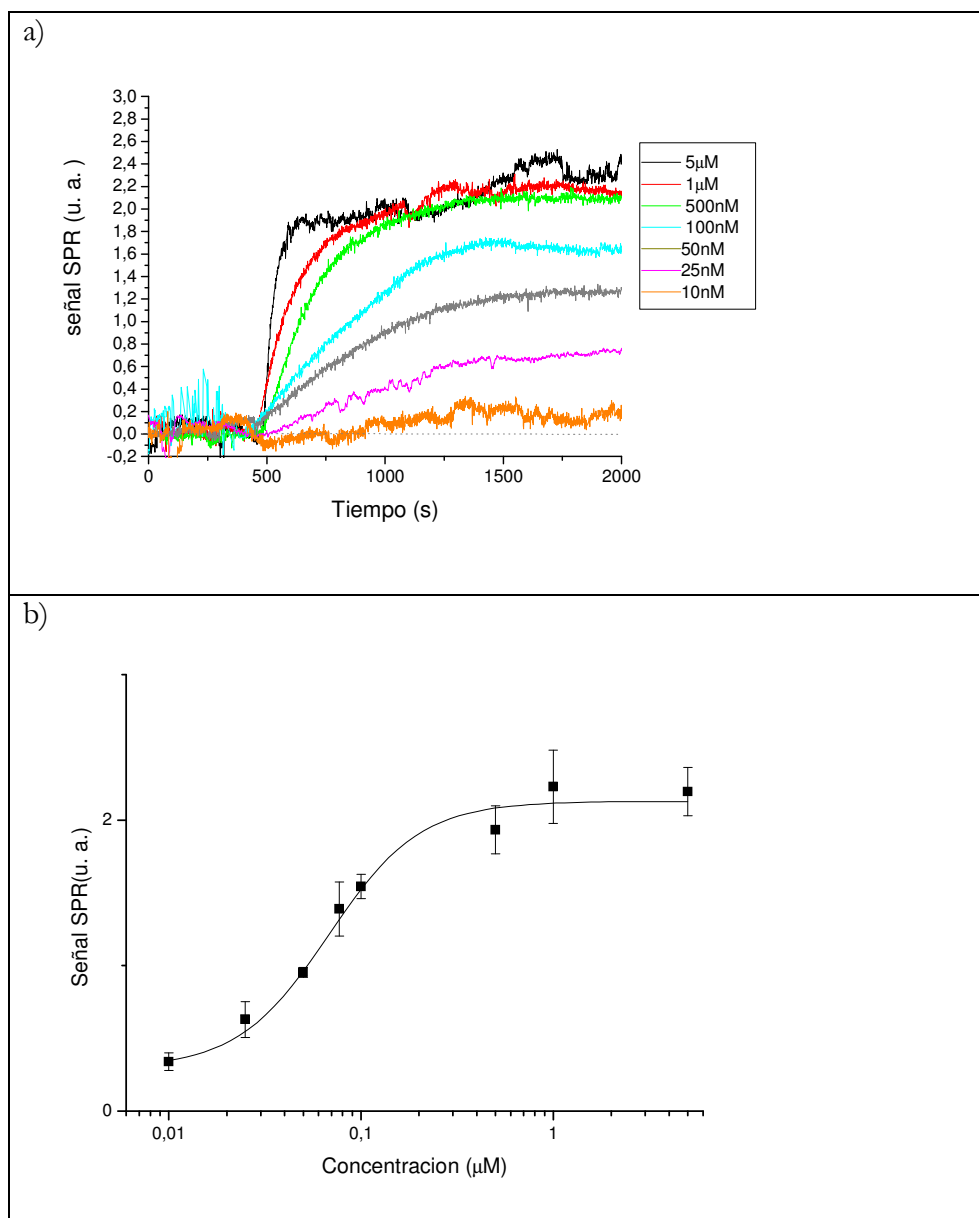


Figura R20. Curvas de hibridación a diferentes concentraciones de complementario para la secuencia 25 mer **(a)** y su correspondiente curva de calibrado **(b)**

Debido a la mayor sensibilidad en la detección de secuencias de mayor tamaño, y dado que en los trabajos con muestras reales no es posible obtener amplicones de tamaño tan pequeño, se eligieron estas secuencias

para demostrar la capacidad de los biosensores SPR para detectar desajustes de una sola base, tanto en posiciones internas como externas.

La optimización de las condiciones de hibridación que permitan la identificación de mutaciones se ha llevado a cabo considerando diferentes condiciones de fuerza iónica, ya que el sistema de SPR empleado en esta Tesis no permite ejercer un control sobre la temperatura durante la hibridación, por lo que todos los experimentos deben llevarse a cabo a temperatura ambiente.

En primer lugar se probó a detectar desajustes en las condiciones anteriores de hibridación a alta fuerza iónica, empleando tres secuencias complementarias: una perfectamente complementaria y dos mutantes (las portadoras del desajuste interno y externo),. En esas condiciones no es posible obtener diferencia en la señal de hibridación de las secuencias mutantes respecto de la totalmente complementaria. Por ello se probaron las siguientes condiciones de tampón de hibridación a pH neutro, en los que se ha intentado reducir de forma gradual la fuerza iónica (Fuerza Iónica, $FI = \frac{1}{2} \sum z_i^2 \cdot C_i$; z = carga; C = concentración):

- i) en tampón fosfato: PB 50 mM - NaCl 750 mM (FI~ 1 M), PB 50 mM (FI~ 230 mM), PB 30 mM (FI~ 180 mM)
- ii) en tampón citrato: SSC 3X (FI~ 720 mM), SSC 1X (FI~ 240 mM) y SSC 0,5X (FI~ 120 mM)

Como se puede apreciar en la Figura R21, solo se consigue diferenciar entre el complementario y el portador del desajuste cuando se trabaja en condiciones de hibridación que empleen tampón SSC 1X o 0,5X. Aunque en SSC 0,5X se aprecia mejor la discriminación entre secuencias, se obtiene una notable pérdida de sensibilidad y las señales se ven muy reducidas en comparación con la condición de SSC 1X. Por esta razón se elige éste último como tampón óptimo de hibridación.

A continuación se llevó a cabo una curva de calibrado para las tres secuencias, en estas condiciones de tampón de hibridación como se muestra en la figura R22. Debido a que trabajar en SSC 1X implica condiciones de mayor astringencia que en las condiciones ideales, el límite de detección ha pasado de 10 nM a 100 nM. Pero sin embargo, se ha ganado en poder de discriminación de las mutaciones.

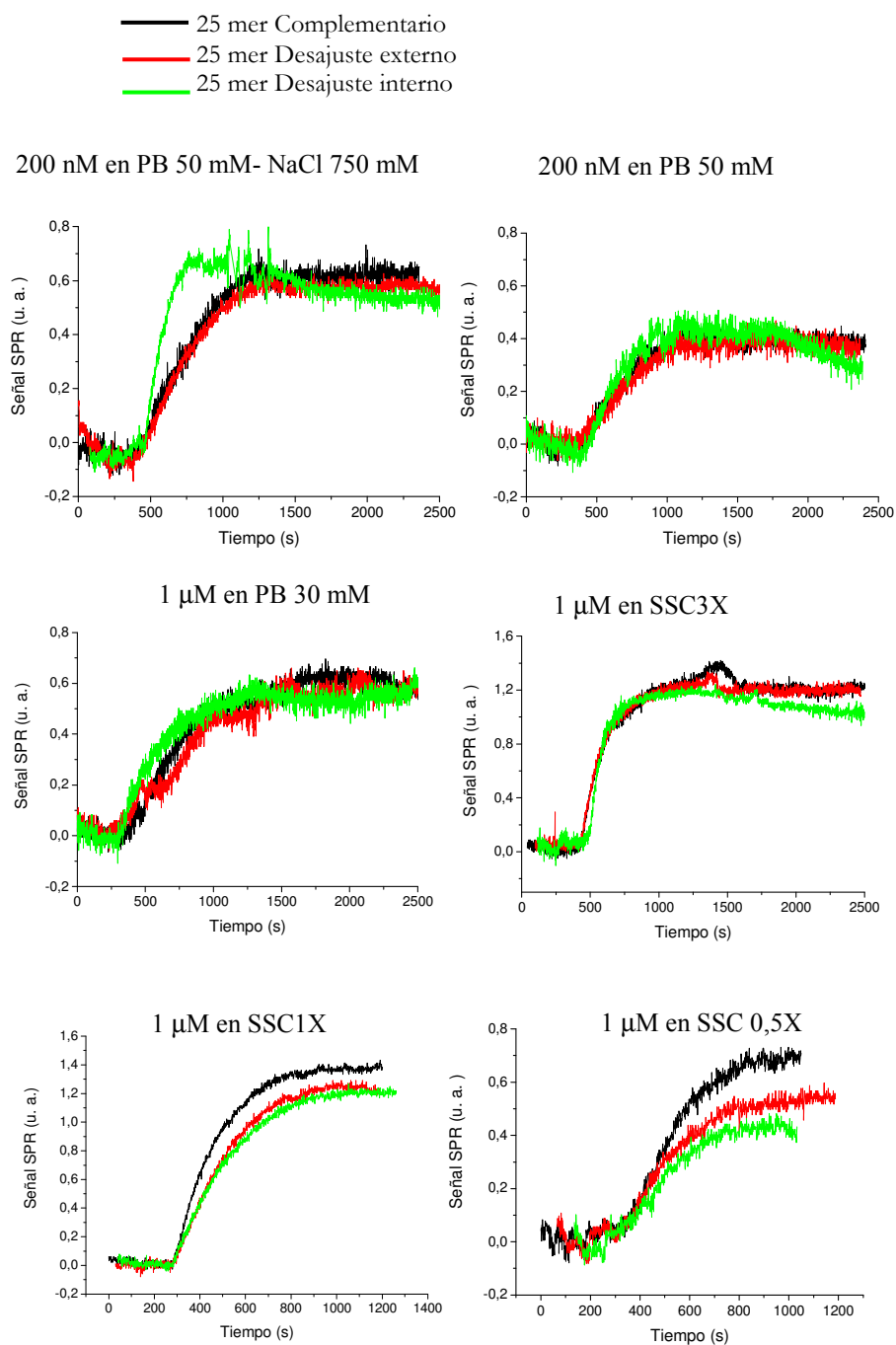


Figura R21. Estudios de hibridación de la secuencia de 25 mer en diferentes soluciones tampón para optimizar la discriminación de desajustes de una sola base. Las concentraciones de complementario y de tampón de hibridación se muestran en cada grafica.

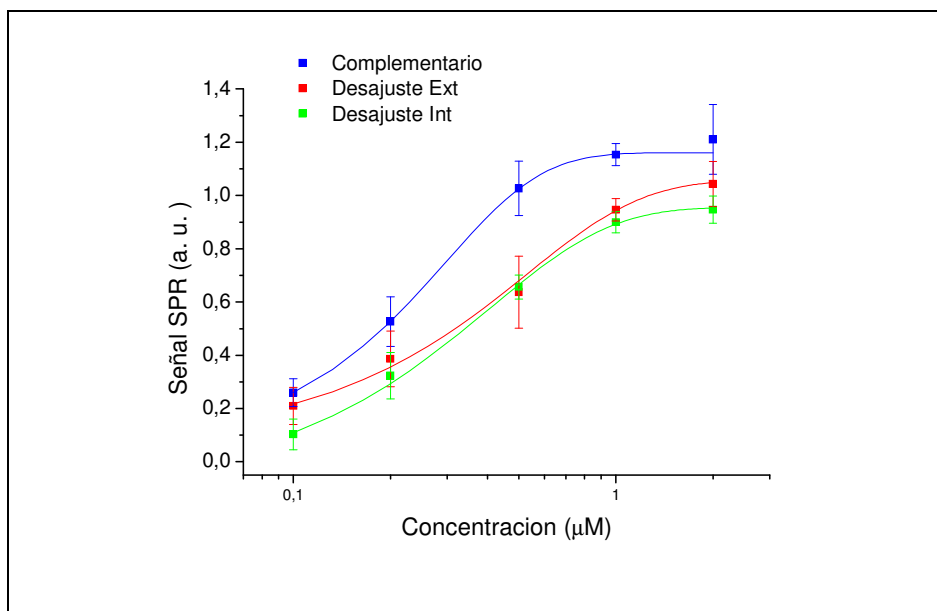


Figura R22. Curva de calibrado para la secuencia complementaria y las portadoras de un desajuste externo e interno.

5.3 Detección en SPR de mutaciones vinculadas al BRCA-1.

En la detección de ADN procedente de muestras reales es condición indispensable realizar una amplificación a partir del genómico del paciente para enriquecer la muestra en la secuencia de ADN que contiene la mutación diana. Este producto de PCR o amplicón puede presentar un tamaño muy variable, aunque el tamaño más pequeño que permite garantizar una amplificación específica (usando cebadores de 18-20 mer) al tiempo que presenta una región interna de entre 11-13 mer para la hibridación con el sensor está en torno a 55-65 mer.

Dado que el formato de detección que hemos optimizado se encuentra aún muy lejos de mimetizar la detección de un amplicón de 55-65 bases, hemos optado por realizar una optimización de las condiciones de hibridación empleando una versión sintética de dicho amplicón para cada una de las secuencias seleccionadas para los fenotipos mutantes (M) y salvaje (WT).

5.3.1 FORMATO DE DETECCIÓN DE UN ÚNICO ANALITO

Para la puesta a punto de las condiciones que permitan no sólo la detección de hibridación, sino también la discriminación de mutaciones con secuencias tipo PCR, se ha elegido, en primer lugar, la secuencia portadora de la mutación 916delTT. Esta mutación implica una delección de dos timinas respecto a la versión salvaje. La optimización de condiciones con esta secuencia permitirá posteriormente desarrollar un formato multianalito en el que se detecten a partir de la misma monocapa hasta cuatro secuencias

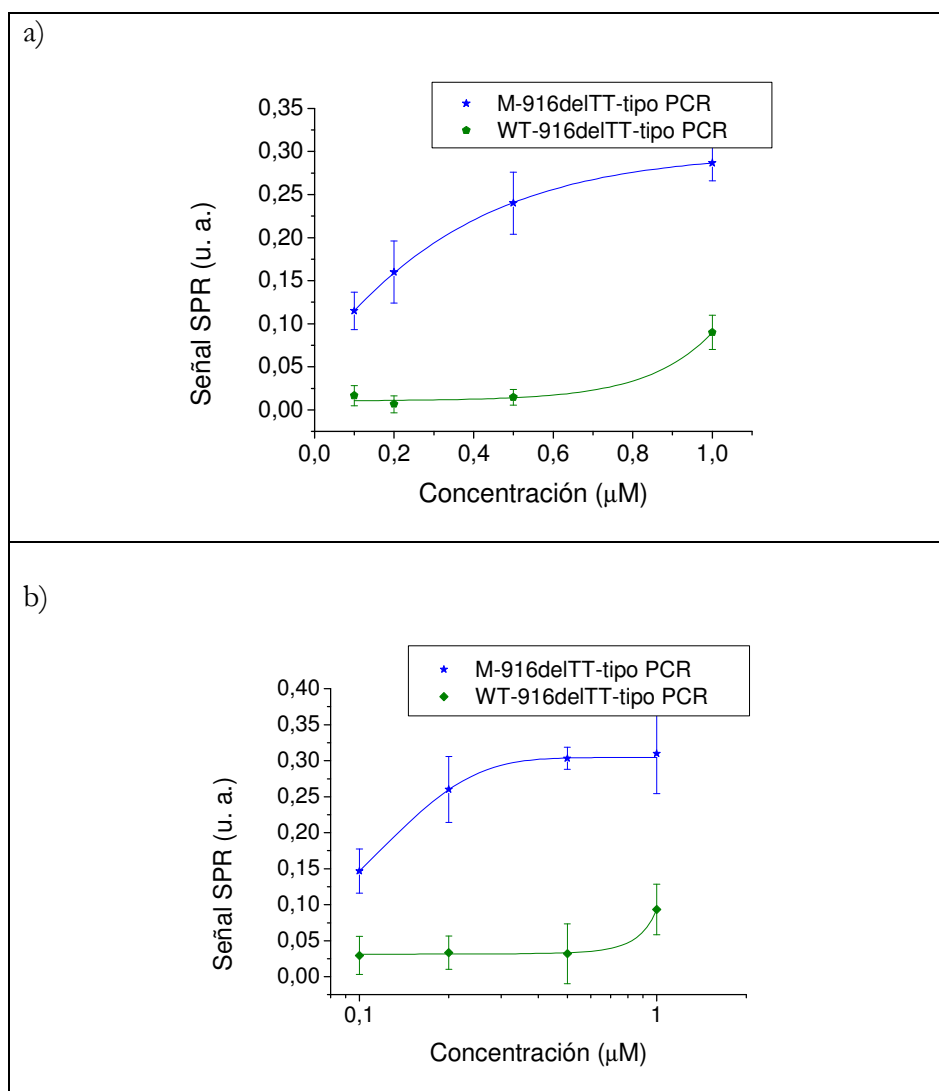


Figura R23. Curvas de calibrado de hibridación de secuencia complementaria correspondiente al fenotipo mutante (azul) y al salvaje (verde) en dos condiciones a) con y b) sin tratamiento de MCH.

diferentes.

Para la detección de la secuencia tipo PCR portadora de la mutación 916delTT se inmovilizó en concentración 1 μ M la secuencia correspondiente al fenotipo mutante modificada con el grupo SH y conteniendo la secuencia espaciadora vertical de 15 timinas. La hibridación se desarrolló en SSC1X del mismo modo que para las secuencias de 25 bases.

Se han probado dos condiciones alternativas en la inmovilización, considerando el uso o no del espaciador lateral MCH. Estos resultados de hibridación se muestran en la Figura R23. Como se aprecia en la figura, los límites de detección son de 100 nM en ambas condiciones aunque se obtiene una mejor diferenciación entre concentraciones en la monocapa no tratada con MCH ya que las señales son ligeramente superiores.

La señal de hibridación del fenotipo salvaje presenta una mayor dispersión y es ligeramente superior que en el caso de haber tratado con MCH debido probablemente a la existencia de una ligera fisisorción del complementario sobre la monocapa. Pero dado que existe una clara discriminación entre ambos fenotipos y las señales son netamente superiores en ausencia de MCH elegiremos no usar MCH en el formato de detección de productos tipo PCR y en la posterior detección de muestras reales.

Esta alta discriminación entre secuencias se ha observado también por radiomarcaje como se muestra en la Figura R24, donde se ilustra la detección de esta secuencia 916delTT tipo PCR. En este experimento se ha llevado a cabo la detección de una cantidad 10 nM (figura R24a) y en presencia de una cantidad de secuencia mutante no marcada en cantidad 20 nM (figura R24b) y 200 nM (figura R24c) y en presencia de una cantidad de secuencia salvaje no marcada en cantidad 20 nM (figura R24d) y 200 nM (figura R24e).

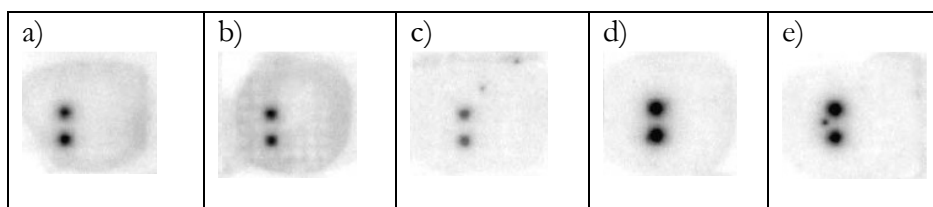


Figura R24. Detección de una cantidad de complementario tipo PCR del fenotipo mutante portador de la mutación 916delTT en concentración 10 nM **(a)** en presencia de una cantidad de secuencia mutante no marcada en cantidad 20 nM **(b)** y 200 nM **(c)** y en presencia de una cantidad de secuencia salvaje no marcada en cantidad 20 nM **(d)** y 200 nM **(e)**.

Como se puede observar en la figura anterior, la hibridación es muy específica constatándose una bajada en la señal únicamente cuando se añade la secuencia correspondiente al fenotipo mutante, pero no cuando se añade la misma cantidad de secuencia del fenotipo salvaje.

5.3.2 FORMATO DE DETECCIÓN MULTIANALITO

El sistema de detección de oligos tipo PCR se ha optimizado también para un formato de detección multi-analito. Para ello se han co-inmovilizado de forma conjunta y simultánea dos secuencias de ADN diferentes y portadoras de dos mutaciones diferentes en el gen del BRCA1.

En primer lugar se ha optimizado la co-inmovilización de la pareja de secuencias 916delTT y 185delAG. Se han buscado las relaciones de concentración entre ambas que maximice la señal de hibridación.

Se ha realizado en un principio dicha co-inmovilización en flujo, trabajando de la misma forma que en el caso del formato uni-analito. Para garantizar al máximo el recubrimiento, se puso un exceso de cada una de ellas y comenzamos la inmovilización con una proporción de secuencias 2:2 μM . Como se observa en la Figura R25 aunque en las condiciones seleccionadas hay discriminación de las secuencias de ambos fenotipos, esta es escasa y las señales son en general, bastante bajas. Se obtuvieron resultados similares también en otras relaciones de secuencias inmovilizadas. Por ello hay que encontrar aquellas condiciones que mejoren al máximo la especificidad.

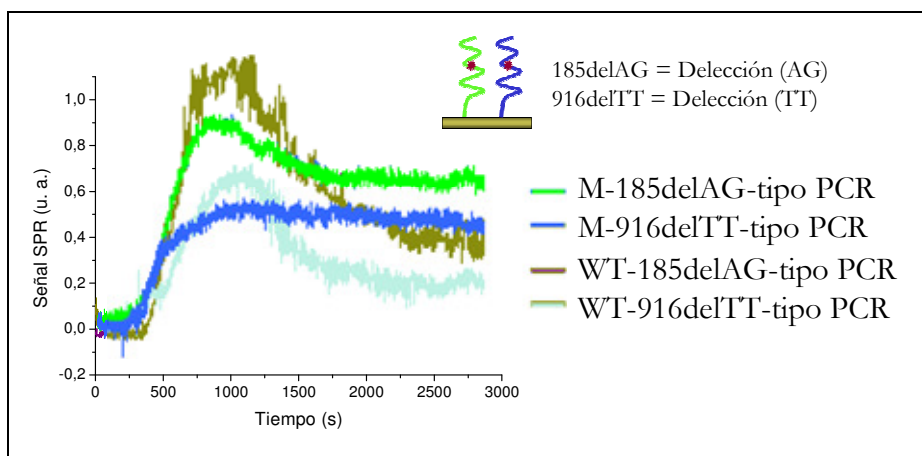


Figura R25. Señal de hibridación para secuencias del fenotipo mutante (M) y salvaje (WT) en concentración 500 nM sobre una monocapa formada por co-inmovilización de la pareja de secuencias 916delTT y 185delAG en proporción 2:2 μM .

Para ello se ha introducido un cierto porcentaje en el tampón de hibridación. La formamida actúa inhibiendo la formación de enlaces de hidrógeno entre bases de modo que dificulta la hibridación de secuencias que no sean perfectamente complementarias aumentando la especificidad.

Al mismo tiempo y para intentar incrementar la magnitud de las señales se aumenta la fuerza iónica del tampón trabajando en SSC 5X. En estas nuevas condiciones se ha estudiado el porcentaje de formamida que permite tener una buena discriminación sin afectar en exceso a la magnitud de la señal de hibridación.

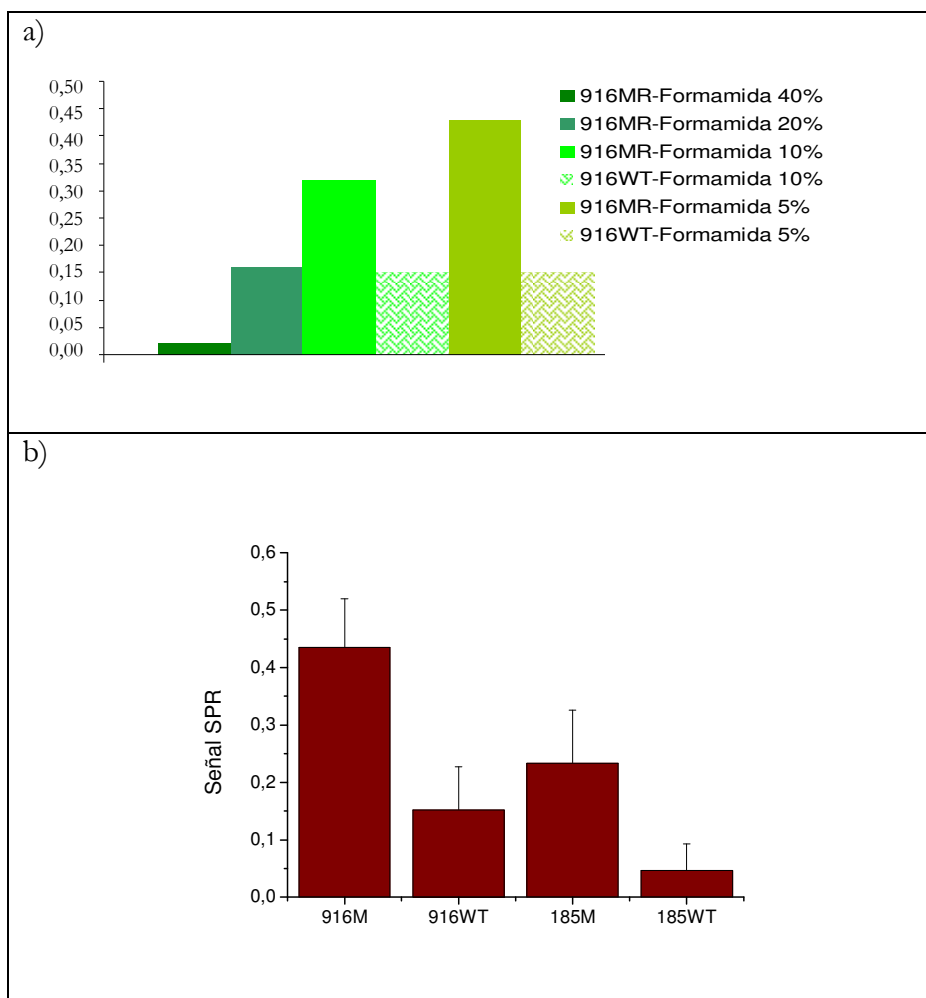


Figura R26. a) Detección de la secuencia 916delTT en concentración 500 nM cuando se encuentra co-inmovilizada con la 185delAG en proporción 2:2 μ M. En **b)** se muestra la detección para ambas secuencias en la misma concentración 500 nM para la condición SSC5X-Formamida 5%.

Los resultados para la detección de la secuencia 916delTT en concentración 500 nM en presencia de diferentes porcentajes de formamida cuando ésta se encuentra co-inmovilizada con la secuencia 185delAG en

proporción 2:2 μM se muestran en la Figura R26a. La mejor discriminación se encontró para la condición SSC5X-Formamida 5%. La señal de detección para una concentración 500 nM para ambos fenotipos en las secuencias 916delTT y 185delAG se muestra en la Figura R26b.

Se puede apreciar también como un porcentaje de formamida de 40% impide por completo la hibridación de secuencias. Por ello se ha empleado este agente como solución regeneradora para los formatos multianalito. En este formato se comenzó empleando NaOH 0,2M y luego HCl 5 mM pero con estos agentes a partir de un cierto número de regeneraciones (15-20 ciclos) el rendimiento de la monocapa disminuía y no permitió la realización de una curva de calibrado con tres réplicas empleando una misma monocapa. Por este motivo, se eligió esta disolución de formamida para ser analizada en los experimentos en formato multianalito.

Durante este proceso de optimización se hallaron también problemas de reproducibilidad cuando se repite un mismo experimento en las mismas condiciones de inmovilización en chips sensores nuevos. Esto puede deberse a que la complejidad implícita en términos de organización que requiere una monocapa mixta hace que la inmovilización necesite de tiempos más largos. La inmovilización en flujo también puede provocar que las moléculas inmovilizadas no siempre se distribuyan en la superficie del mismo modo y variaciones en el flujo pueden inducir que la monocapa no se reorganice de la misma forma en cada experimento y que por tanto no responda con la misma eficiencia. Para comprobarlo se decidió llevar a cabo la inmovilización ex-situ empleando un tiempo de inmovilización de 3h.

En la Figura R27 se puede observar un ejemplo de medida en continuo para una hibridación 125 nM de la secuencia 916delTT en una monocapa mixta con la secuencia 185delAG en proporción 2:2 μM creada de forma ex-situ. Se puede observar como ambos fenotipos, mutante y salvaje, son perfectamente diferenciables y como un tratamiento de regeneración con formamida al 35% en agua es efectivo. En estas condiciones la formamida permite una perfecta regeneración al tiempo que permite una mayor durabilidad de la monocapa inmovilizada, ya que puede ser utilizada durante al menos cuarenta veces.

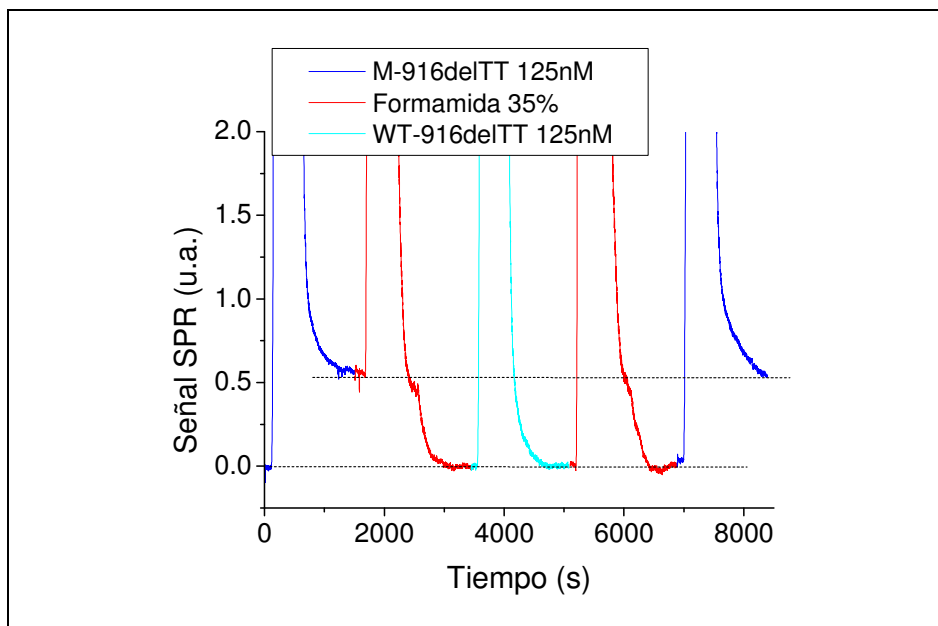


Figura R27. Medida en continuo para una hibridación 125 nM de ambos fenotipos de la secuencia 916delTT en una monocapa mixta con la secuencia 185delAG en proporción 2:2 μ M creada de forma ex-situ.

Con la monocapa así optimizada se realizó una curva de calibrado con tres réplicas por muestra para determinar la sensibilidad y la reproducibilidad de la detección (Figura R28).

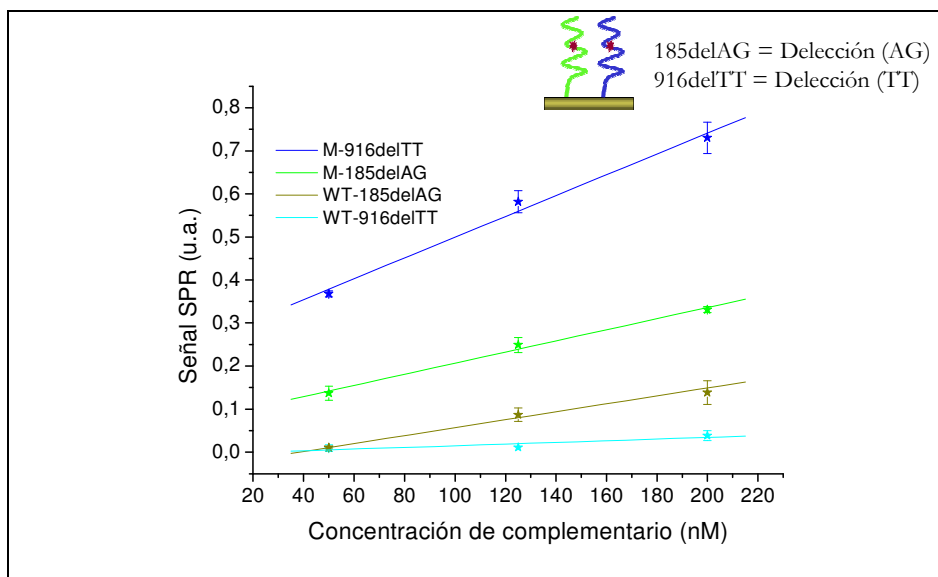


Figura R28. Curva de calibrado en formato bi-analito para las secuencias 916delTT y 185delAG en configuración 2:2 μ M

De la curva de calibrado se puede observar que se ha conseguido un límite de detección excelente por debajo de 50 nM. Este límite de detección está calculado de forma experimental siguiendo un criterio de discriminación estricto para minimizar la posibilidad de error en la identificación de ambos fenotipos, por lo que el límite de detección real puede ser incluso inferior. Este criterio supone que haya una diferencia (ΔZ) entre las señales de las secuencias de ambos fenotipos de al menos 0,1 unidades de resonancia y que la magnitud de la señal correspondiente al evento de hibridación del fenotipo mutante sea superior a 0,1 unidades de resonancia.

Del calibrado anterior se puede constatar también que el grado de discriminación entre fenotipos es mucho mayor para la secuencia 916delTT que para la secuencia 185delAG. Un ejemplo de discriminación 125 nM para ambas secuencias se muestra en la Figura R29. Se puede observar que aunque la diferencia entre fenotipos para la secuencia 185delAG es clara, esta diferencia está sólo un poco por encima del límite ($\Delta Z = 1,5$) de nuestras condiciones de sensibilidad.

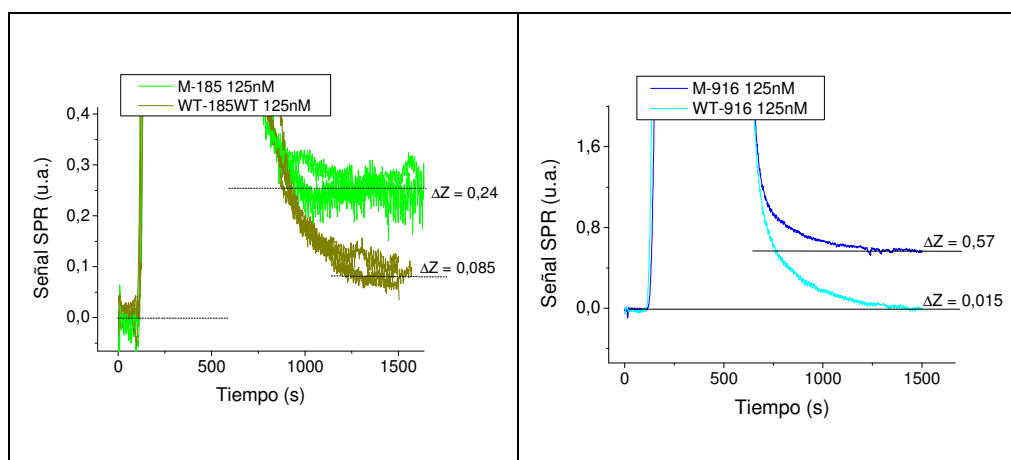


Figura R29. Curva de hibridación 125 nM para la secuencia 185delAG (izda.) y 916delTT (dcha.) en configuración 2:2 μM donde se muestra el poder de discriminación para ambas secuencias.

Por este motivo se ha realizado una optimización de la capacidad de discriminación de la secuencia 185delAG probando otras relaciones de concentración de inmovilizado. La figura R30 muestra la señal de hibridación 125 nM de ambos fenotipos para las dos secuencias, 916delTT y 185delAG en configuración 2:3 y 4:5, además de la anterior 2:2 μM . Como se puede apreciar en la figura, en ninguno de los casos se consigue un grado de discriminación análogo al obtenido por la secuencia 916delTT, aunque para la configuración 2:3 μM se tiene una magnitud de señal muy alta que permite

que se analice la posibilidad de aumentar el grado de discriminación de esta secuencia por adición de un porcentaje mayor de formamida en el tampón de hibridación.

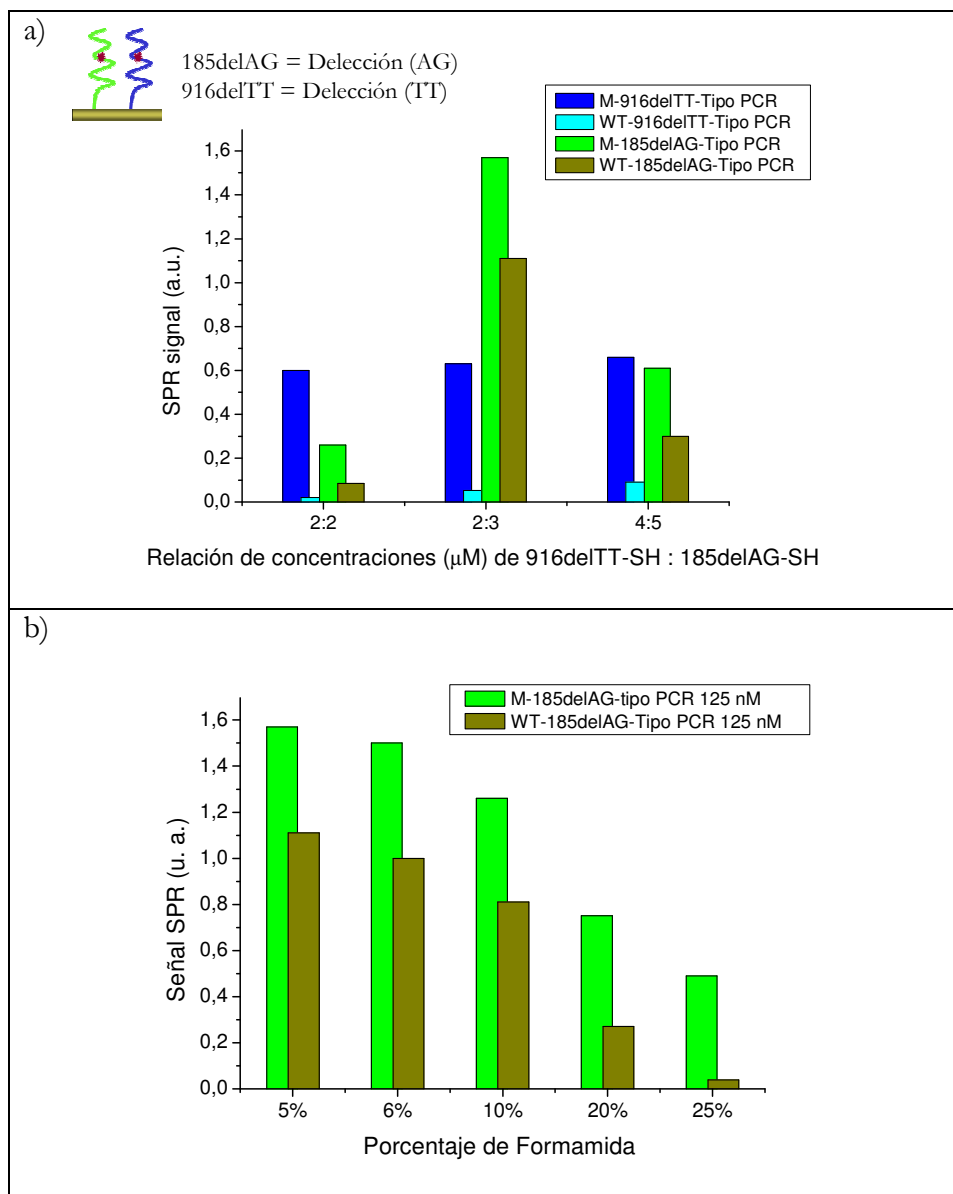


Figura R30. a) Relación de proporciones de secuencias inmovilizadas para optimizar las condiciones de inmovilización que maximizan la detección y la discriminación para la pareja de secuencias 916delTT/185delAG empleando una concentración de hibridación de 125 nM. En **b)** se muestra la señal de hibridación para la condición 2:3 μM considerando diferentes porcentajes de formamida.

Se puede apreciar que un porcentaje de formamida del 20-25% consigue un máximo de discriminación con una señal de fenotipo salvaje mínima. Un ejemplo de señal en estas condiciones de hibridación para la secuencia 185delAG y 916delTT en la configuración 2:3 μM , se muestra en la Figura R31, donde la secuencia 916delTT se ha hibridado en tampón con formamida 5% y en el caso del 185delAG con formamida 25%.

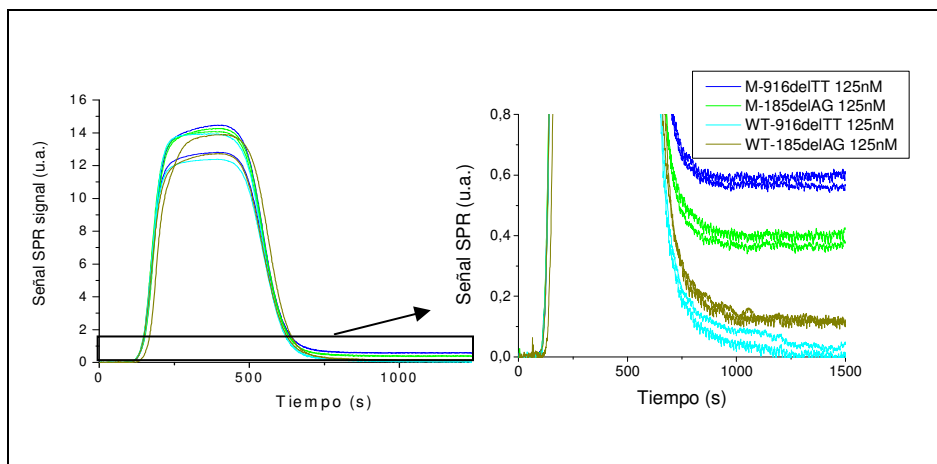


Figura R31. Curva de hibridación 125 nM en configuración 2:3 μM para las secuencia 185delAG y 916delTT, donde en la hibridación de la secuencia 185delAG se ha empleado formamida al 25%.

En estas condiciones constatamos que la reproducibilidad de experimento a experimento es alta, así como la magnitud de las señales se ha conseguido optimizar y elegir las condiciones de inmovilización que maximizan la detección y la discriminación para la pareja de secuencias 916delTT/185delAG. Por este motivo en adelante se realizaron todas las restantes inmovilizaciones de forma ex-situ.

De forma análoga se ha procedido a optimizar la detección para la co-inmovilización de secuencias R1443X y 5382insC. Al igual que para la pareja anterior, se han probado diferentes relaciones de concentraciones en la inmovilización. La relación de las diferentes proporciones se muestra en la Figura R32. La hibridación a 125 nM se ha llevado a cabo en SSC 5X con 5% de formamida.

De la figura se deduce que la mejor condición es la relación de R14434X 5382insC igual a 1:0,5 μ M.

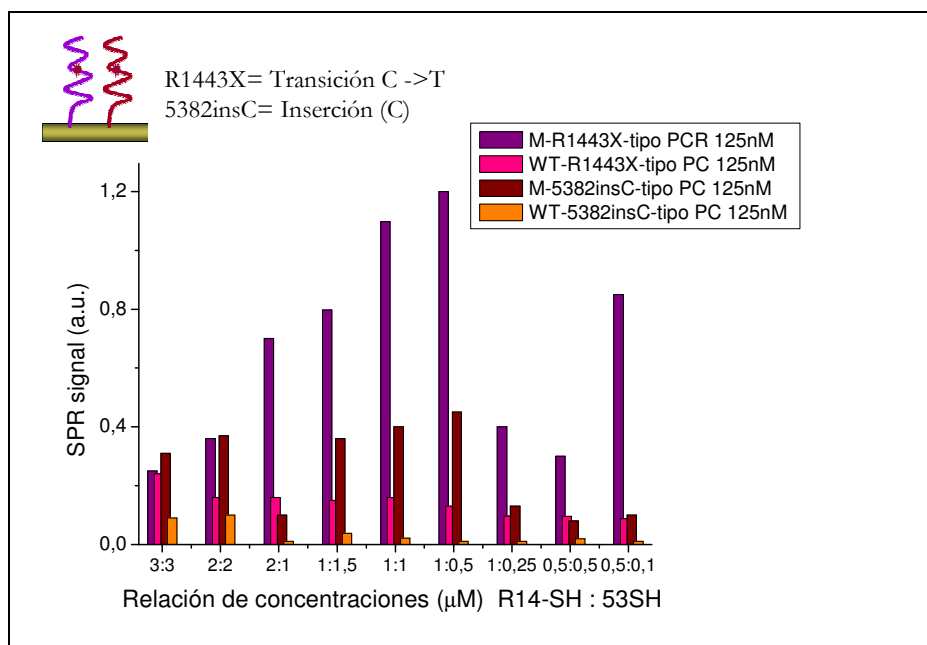


Figura R32. Señal de hibridación 125 nM en SSC5X-formamida 5% para diferentes proporciones de secuencias R1443X y 5382insC coinmovilizadas.

Con estas condiciones ya fijadas se procedió a realizar una curva de calibrado para diferentes concentraciones de secuencia complementaria del fenotipo mutante y salvaje, con la pareja 916delTT/185delAG coinmovilizada en un canal (Figura R30) y la pareja R1443X/5382insC en el otro canal del biosensor (Figura R31). En estas figuras, se muestra también un ejemplo de las curvas obtenidas para la concentración 125 nM.

En esta pareja de secuencias se ha añadido formamida al 5% también en el buffer continuo para disminuir el cambio de índice que se tenía en la hibridación y que provocaba que la señal tardase más tiempo en estabilizarse. Por ello en la figura se observa un cambio de índice neto en la señal mucho menor.

Se puede observar que se ha conseguido un grado de discriminación muy bueno en ambas secuencias presentando para la menor de las concentraciones analizadas, la de 50 nM, una diferencia de señales entre fenotipos para la secuencia R1443X de $\Delta Z=0,5$ y para la secuencia 5382insC de $\Delta Z=0,25$. Además a esa concentración las señales del fenotipo mutante son muy superiores al límite de $\Delta Z=0,1$ impuesto en las condiciones de sensibilidad establecidas en nuestros experimentos, por lo que se podría decir

que para esta pareja de secuencias el límite de detección es muy inferior al 50 nM demostrado aquí. Es interesante destacar que, por debajo de 50 nM la respuesta del fenotipo salvaje es nula en ambas secuencias, por lo que por debajo de esa concentración cualquier señal que se obtuviera se podría asociar de forma inequívoca al fenotipo mutante. Por tanto, se podría flexibilizar la condición de sensibilidad y aceptar señales por debajo de 0,1 de magnitud. Este factor permitiría detectar mutaciones en un rango de concentraciones aún mas bajo.

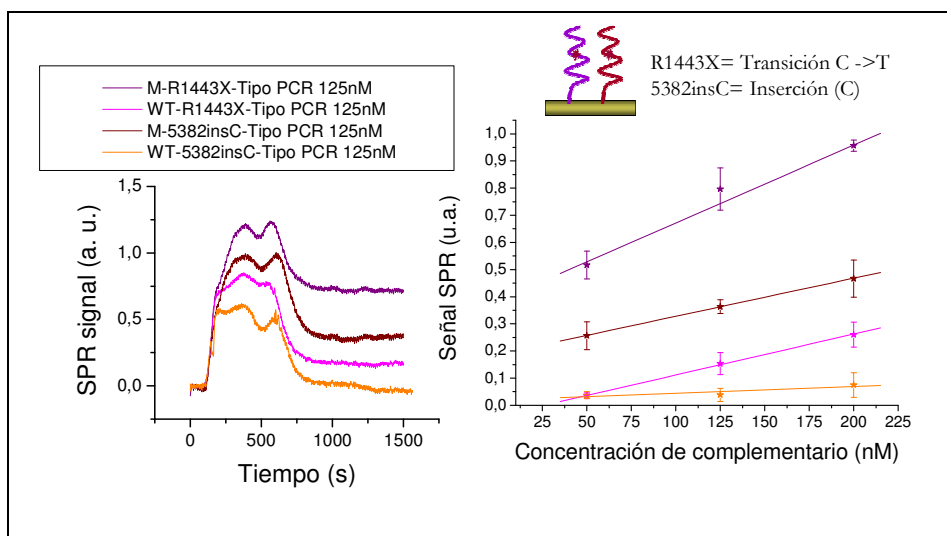


Figura R33. Ejemplo de las curvas de hibridación obtenidas para la concentración 125 nM para los fenotipos mutante y salvaje y curva de calibrado para diferentes concentraciones de los mismos con el multianalito de R1443X/5382insC.

Finalmente se ha probado a analizar si este formato multianalito se podía extender para abarcar la detección de un mayor número de secuencias. Se ha probado a realizar la co-inmovilización simultánea de las cuatro secuencias anteriormente analizadas. Para ello de forma análoga se han probado diferentes proporciones de los cuatro oligos destinados a la inmovilización, como muestra la Figura R34.

Con la excepción de la hibridación de la secuencia 185delAG, que se llevó a cabo en SSC5X en 25% de formamida, el resto de secuencias se hibridaron en concentración 125 nM empleando 5% de formamida. De la figura se puede extraer que la mejor relación de concentraciones se encontró para la proporción de 916delTT:185delAG:R1443X:5382insC 2:1:1:2 μ M.

Un ejemplo de detección por triplicado de secuencias 125 nM se muestra en la Figura R35 con la monocapa mixta de cuatro secuencias co-inmovilizadas en proporción 2:1:1:2 mM.

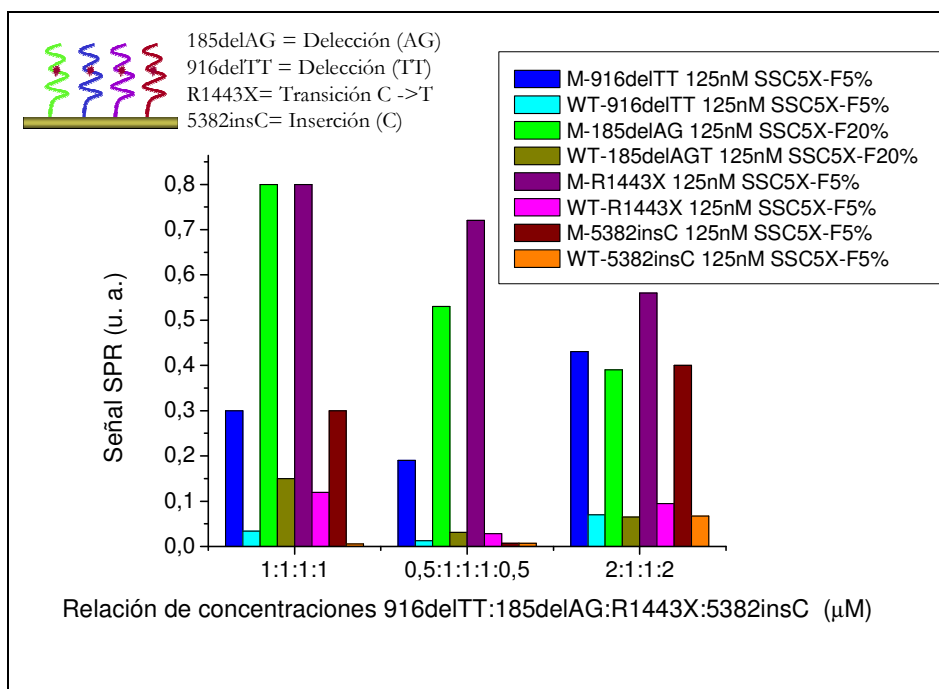


Figura R34. Señal de hibridación 125 nM para diferentes proporciones de secuencias 916delTT, 185delAG, R1443X y 5382insC coinmovilizadas simultáneamente.

Para esta relación se consigue un altísimo nivel de discriminación en todos los casos, muy superior al que se tenía en el formato de dos secuencias, con una diferencia de señales $\Delta Z \sim 0,4$. Esto indica que este formato de monocapa permite un mayor grado de accesibilidad de la secuencia complementaria, puesto que unas secuencias actúan de espaciadoras de las otras. Asimismo se ha conseguido aumentar la magnitud de la señal en comparación con el formato de dos secuencias, indicando que además de mejorar la capacidad de discriminación, se ha mejorado la sensibilidad con respecto al formato anterior.

Este formato de detección múltiple de cuatro secuencias es el que se ha utilizado para la detección de muestras reales, puesto que es el que mejores prestaciones presenta tanto en sensibilidad como en capacidad de discriminación entre fenotipos mutante y salvaje.

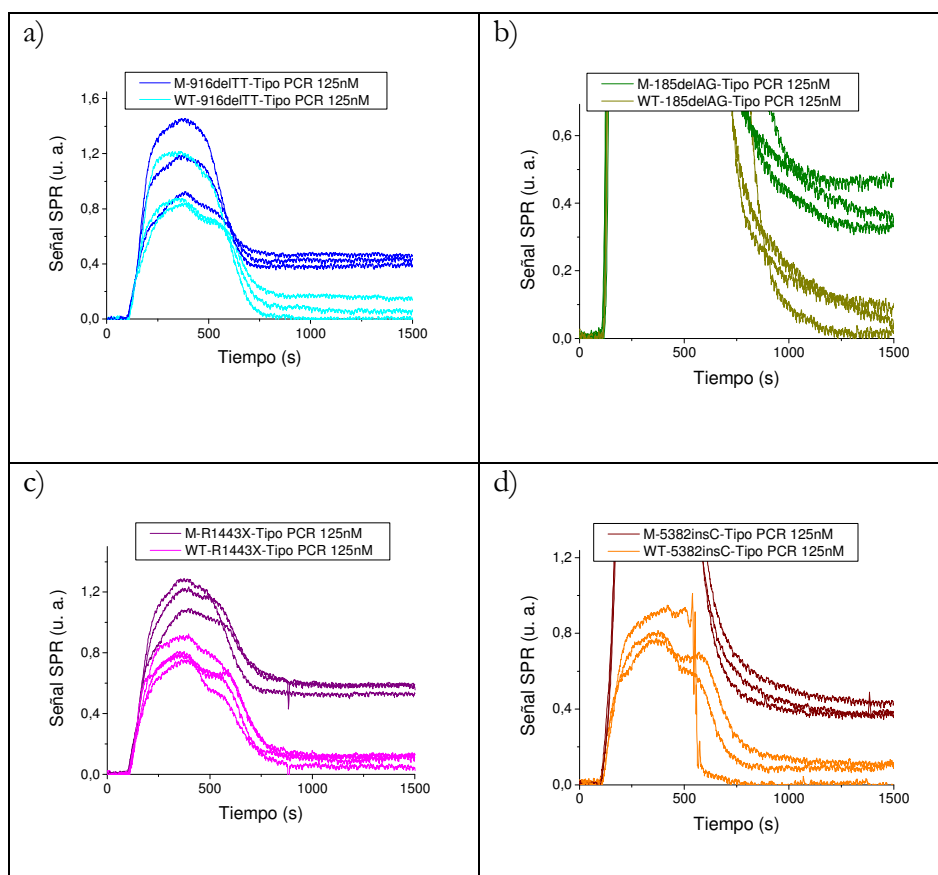


Figura R35. Curvas por triplicado de detección de secuencias en concentración 125 nM en formato multianálisis de cuatro secuencias.



DISCUSIÓN

6.1 Optimización de las condiciones de inmovilización e hibridación en biosensores

6.1.1 SELECCIÓN DEL GRUPO FUNCIONAL. IMPORTANCIA DE LOS PROCESOS DE QUIMI/FISIADSORCIÓN EN LA RESPUESTA BIOSENSORIA

Durante la inmovilización de biomoléculas en superficies tienen lugar siempre de forma conjunta dos tipos de procesos de adsorción: adsorción física o *fisiadsorción* y adsorción química o *quimiadsorción*. En la adsorción física las interacciones predominantes son de tipo van der Waals, mientras que en la adsorción química las interacciones entre la biomolécula y la superficie tiene lugar por la formación de un enlace covalente. Por ello, la adsorción química, es un proceso más selectivo que depende principalmente de la naturaleza de las sustancias involucradas. Además permite ejercer un buen control de la densidad de la moléculas inmovilizadas y la organización espacial de sus componentes. Estos dos aspectos son claves para maximizar la eficiencia del reconocimiento molecular que garanticen una correcta respuesta del dispositivo biosensor.

En los biosensores empleados en esta Tesis la inmovilización se ha llevado a cabo empleando la química de las monocapas autoensambladas. Esta química permite que la quimiadsorción tenga lugar a través del enlace covalente entre un átomo de azufre del grupo mercapto con que se funcionaliza la cadena de ADN y el oro. Pero al mismo tiempo las cadenas también pueden interaccionar de forma no covalente por fisiadsorción con la superficie de oro, adoptando una configuración horizontal con varios puntos de unión entre las bases nitrogenadas de la cadena e ADN y el oro.

La demostración de la existencias de fisiadsorción del ADN en la superficie de oro se puede observar en la imagen de la Figura R1. La figura muestra como la señal de radiomarcaje de una muestra de ADN funcionalizada y que es capaz de quimiadsorberse es similar a la una muestra con ADN no modificado, que sólo puede unirse al oro por fisiadsorción, confirmando que durante la inmovilización ambos fenómenos tienen lugar. Este hecho ya ha sido mencionado en la literatura específica, y se ha demostrando como la presencia de moléculas fisiadsorbidas contribuyen negativamente a la hibridación [129-132].

Por este motivo en el proceso de inmovilización de ADN se ha elaborado una metodología química que maximiza la quimiadsorción frente a la fisiadsorción para generar una respuesta más reproducible y selectiva.

Para estudiar los procesos de quimi/fisiadsorción durante la inmovilización del ADN, el primer aspecto que se ha analizado ha sido el del grupo funcional enlazante, susceptible de ser utilizado para la inmovilización. Comercialmente se suministran diferentes grupos enlazantes portadores de un grupo mercapto, en la forma sulfidrilo (-SH) o disulfido (-SS-).

En la literatura no existen apenas estudios que analicen el efecto de tener el átomo de azufre en un estado de oxidación reducida (para la forma sulfidrilo) u oxidado (para la forma disulfido). En el caso de los disulfidos tampoco se conoce el efecto que tiene la molécula que se une a la cadena de ADN por el puente disulfuro sobre el proceso de quimiadsorción.

Por ello se ha estudiado la eficiencia relativa para inmovilizar en oro ADN funcionalizado con tres tipos de grupo mercapto diferentes: un grupo sulfidrilo (DNA-SH), un grupo disulfido -SS- que surge por dimerización de dos moléculas de ADN modificadas con el grupo SH (DNA-SS-DNA) y un grupo disulfido que por un extremo une la cadena de ADN y por el otro un pequeño grupo orgánico protector dimetoxitritilo (DNA-SS-DMTO).

En la Figura D1 se muestra un modelo tridimensional representativo de la configuración espacial de los tres tipos de moléculas de ADN inmovilizadas sobre oro.

Una primera aproximación para determinar el grado de quimiadsorción de estas tres especies de ADN es estudiar la fuerza con que están adsorbidas al oro. Para ello se emplea una molécula con capacidad de desplazar cualquier especie que no esté correctamente quimiadsorbida. La molécula elegida ha sido el mercaptohexanol (MCH) [129-132] cuya efectividad en la eliminación de ADN fisiadsorbido en oro puede contemplarse en la Figura R1.

Este estudio con MCH ha sido realizado tanto en el biosensor de SPR como en el nanomecánico y ha demostrado que las distintas monocapas tienen un comportamiento diferente en su respuesta al tratamiento con MCH. En SPR se observa como el grado de MCH incorporado en la monocapa de ADN previamente inmovilizada es máximo en el caso del dímero de ADN y mínimo en el caso del ADN con la funcionalización sulfidrilo.

En el estudio con biosensores nanomecánicos, se refleja una mayor respuesta de tensión superficial en el caso en el que el MCH se incorporó a la monocapa de DNA-SS-DNA, indicando también que la máxima incorporación de MCH tiene lugar en ésta monocapa. En estos dispositivos la menor señal de MCH fue registrada en la monocapa de ADN con la funcionalización SH.

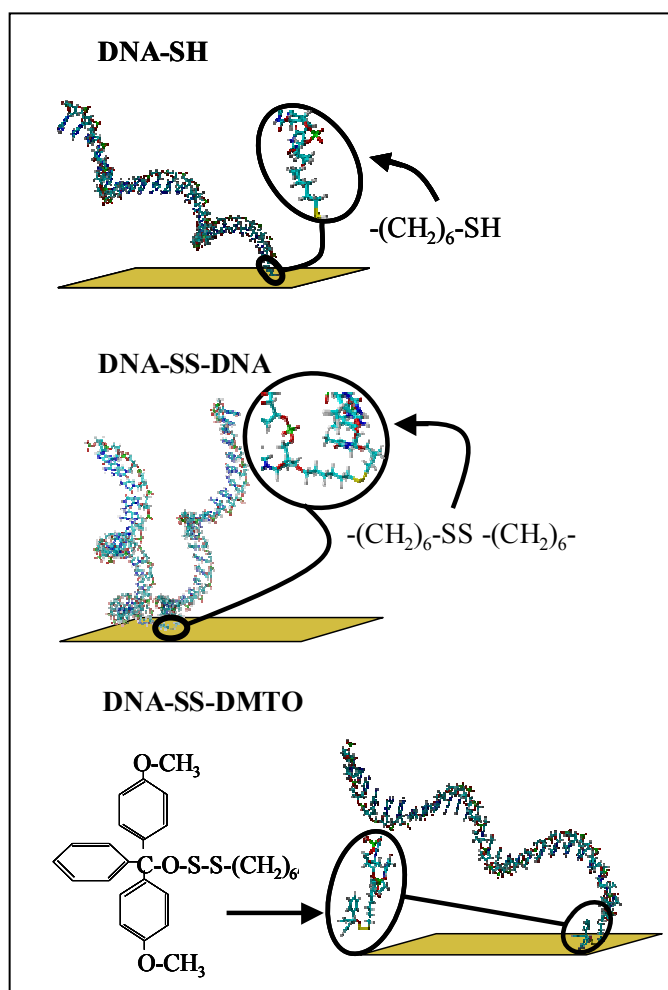


Figura D1. Modelo tridimensional representativo de la configuración espacial de los tres tipos de moléculas de ADN inmovilizadas sobre oro

Según estos datos la fisiadsorción es mayor para los disulfidos de ADN, especialmente para el caso de la versión dimérica, siendo el DNA-SH el que mayor grado de quimiadsorción presenta.

De forma paralela se ha estudiado por XPS, radiomarcaje y fluorescencia el comportamiento de los tres tipos de ADN funcionalizado y el efecto del MCH sobre estas monocapas con el fin de obtener datos precisos de recubrimiento molecular, así como del grado de quimi- y fisiadsorción de cada una de ellas de forma más cuantitativa.

En cuanto al recubrimiento de cada monocapa, la técnica de radiomarcaje proporciona valores de densidad de moléculas del orden de 2-

$6 \cdot 10^{12}$ molec/cm² antes de incorporar el MCH y entre $6 \cdot 10^{11}$ - $1 \cdot 10^{12}$ molec/cm² tras su incorporación (Figura R3). La post-inmovilización del MCH implica en todos los casos un descenso del orden del 60% respecto de la señal inicial. A pesar de que las medidas presentan un error elevado, se puede apreciar que se tiene un mayor recubrimiento para el DNA-SH, seguido de DNA-SS-DMTO y del DNA-SS-DNA que mostró los resultados más bajos.

Por XPS los valores de recubrimiento calculados fueron mucho mayores para las tres monocapas. Dichos valores se mantienen en el rango de lo publicado por otros autores [131, 132], con la excepción del valor de 2.1×10^{14} molec/cm² calculado para el DNA-SH que es superior a lo reflejado en la literatura, lo que indica la presencia de un elevado grado de empaquetamiento. Estas discrepancias entre técnicas pueden provenir de que los valores de XPS se calculan de forma teórica a partir del cálculo de la señal del Au debido únicamente a la primera capa y considerando una estimación del número de moléculas de S por cm² suponiendo una superficie plana y perfecta de Au. Por esta razón los cálculos de XPS podrían estar ligeramente sobreestimados.

El recubrimiento también se analizó a tiempos cortos de inmovilización para estudiar el comportamiento de los tres tipos de ADN funcionalizado en los primeros momentos de formación de la monocapa. Se eligió un tiempo de inmovilización de 5 min. muy similar al tiempo que permanece la muestra en el sensor en flujo. En los biosensores la medida tiene una duración total de unos 18 min., de los cuales, solamente unos 8 min. corresponden al tiempo que la muestra permanece en contacto con la superficie sensora en las condiciones de flujo en las que se trabaja (Figura D2). Las medidas de recubrimiento a tiempos cortos permiten por tanto mimetizar la situación que se obtiene en los biosensores.

El recubrimiento que reflejan las medidas de XPS a tiempos cortos es diferente a los obtenidos en una inmovilización de 15 h, donde se supone que la inmovilización es completa y se ha alcanzado el máximo valor de recubrimiento. En estas condiciones la monocapa se supone que no está del todo formada y el grado de fisisorción debe ser mayor. Teóricamente el aumento del tiempo de inmovilización favorece un aumento del recubrimiento por quimiadsorción al tiempo que la monocapa se reorganiza. Esto es lo que se observa para el caso del DNA-SH que a tiempos cortos presenta un recubrimiento 2,25 veces inferior al de tiempos largos. Sin embargo el comportamiento de los disulfidos de ADN es radicalmente opuesto. El mayor recubrimiento se observa a tiempos cortos y el aumento del tiempo no permite que esta magnitud aumente, observándose incluso un descenso de 1,25 veces en el DNA-SS-DMTO y de 3 veces en el DNA-SS-DNA, indicando la presencia de fenómenos de desorción. Este descenso en el recubrimiento de los disulfidos con el tiempo, que puede resultar

sorprendente, ha sido descrito con anterioridad y únicamente puede explicarse en términos de desorción de dichas moléculas. Schelenoff y colaboradores explican la desorción a largo del tiempo por nueva formación del enlace disulfido [236]. Además los disulfidos presentan un mayor volumen e impedimento estérico, lo que dificulta que nuevas moléculas entren dentro de la monocapa, y por tanto que con el tiempo aumente el recubrimiento en el mismo grado que ocurre en el DNA-SH. Estudios de inmovilización de tioles y disulfidos con moléculas orgánicas también demostraron comportamientos diferentes entre ellos constatando que los alquiltioles eran adsorbidos de forma preferente a los disulfidos en una relación 75:1 [237].

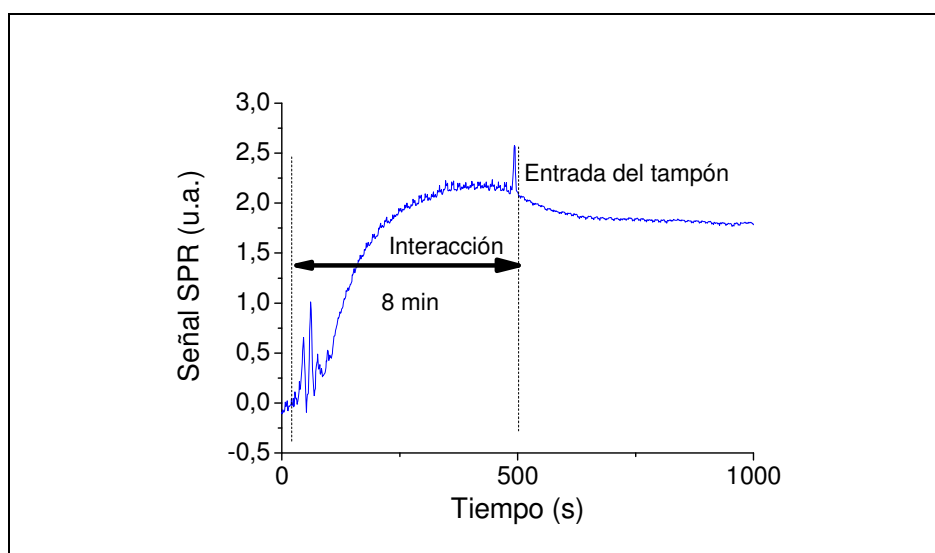


Figura D2. Curva representativa de una interacción donde se muestra el tiempo que permanece el analito en la celda.

Los estudios de XPS sobre el efecto del MCH también demuestran un comportamiento diferente para cada monocapa. De forma análoga a lo obtenido en biosensores y radiomarcaje, se produce una considerable incorporación de moléculas de MCH en todas las monocapas tal como refleja el importante aumento del pico de azufre en todas ellas. El recubrimiento final que se alcanza es de $2\text{--}2,6 \times 10^{14}$ moléculas/cm², muy similar en los tres casos, indicando que el MCH consigue rellenar todo el espacio disponible. Cuando éste valor se normaliza respecto de la señal inicial de azufre para cada tipo de funcionalización se obtiene la eficiencia de recubrimiento para cada uno de ellos. Este valor es de 49% para el DNA-SH y del 23% y 26%

para el DNA-SS-DMTO y el DNA-SS-DNA, respectivamente. Estos valores nuevamente confirman la mayor eficiencia del DNA-SH en la formación de monocapas autoensambladas por quimiadsorción.

El grado de quimiadsorción de cada una de las especies de ADN se ha determinado por XPS mediante el análisis de las componentes S1 y S2 implicadas en los picos del azufre 2p correspondientes a los experimentos de inmovilización de cada tipo de ADN (Figura R5). La componente S1 está en la literatura considerada como debida únicamente a la quimiadsorción del azufre sobre el oro [237-246] por medio del enlace S-Au [247]. En el ADN con la modificación disulfido, esta quimiadsorción se presume que tiene lugar por ruptura previa del puente disulfuro para inmovilizarse como dos especies separadas, como ocurre con otros disulfidos estudiados [237, 238, 248-251]. El origen de la componente S2 es más difícil de identificar y se ha asociado tanto a especies de azufre fisiadsorbidas sobre el oro [239, 252, 253] como a la presencia directa del grupo disulfido [237, 240-242] o debido a un daño por radiación durante el proceso de medida que generaría nuevas especies de azufre [239, 243]. Dado que la componente S1 parece estar inequívocamente relacionada con la cantidad de azufre quimiadsorbido en superficie, una visualización de la evolución de esta componente con el tiempo de inmovilización, así como tras el tratamiento con MCH, permite identificar la tendencia a la quimiadsorción de cada una de las especies modificadas de ADN estudiadas.

La componente S1, en tan sólo 5 min de inmovilización, puede observarse para todos los casos y es en todos ellos superior a la componente S2 (figura R5), indicando que la quimiadsorción ocurre de forma espontánea y rápidamente en todos ellos. Es interesante observar que la cantidad de componente S1 en esos primeros momentos de inmovilización es muy similar para el DNA-SH (79%) y el DNA-SS-DNA (72%) y mucho menor para el DNA-SS-DMTO (54%) cambiando de forma notable con el tiempo de inmovilización. Tras 15 h, el DNA-SH mantiene la misma proporción de S1 (81%), el DNA-SS-DMTO aumenta 1,2 veces (64%) y el DNA-SH ve reducida esta componente 1,4 veces (52%). Estos resultados indican que:

- i) la monocapa generada por la inmovilización del DNA-SH está muy organizada con la mayoría de moléculas quimiadsorbidas desde los comienzos y que el tiempo de inmovilización solo contribuye a aumentar el recubrimiento y con ello la densidad y el grado de empaquetamiento de la monocapa
- ii) la monocapa generada por el DNA-SS-DMTO presenta mayores dificultades iniciales para quimiadsorber y requiere de mayor tiempo para terminar de organizarse lo que se refleja en el aumento de la componente S1 con el tiempo, sin aumento del porcentaje de recubrimiento.

- iii) la monocapa de DNA-SS-DNA se formaría inicialmente por una quimiadsorción de un porcentaje de moléculas similar al DNA-SH pero el importante volumen estérico que representa tener dos cadenas grandes y cargadas negativamente a ambos lados del puente disulfuro impediría el acceso de nuevas moléculas a la monocapa, por lo que el recubrimiento con el tiempo no se aumenta y además se constata una importante desorción de moléculas provocando que tanto la componente S1 como el grado de recubrimiento se vean reducidos a tiempos de inmovilización más largos.

Estos resultados concuerdan con lo encontrado para otras especies de disulfidos en los que se han observado mayores dificultades para romper el puente disulfido y quimiadsorber, entre otras causas porque requieren la existencia de dos posiciones accesibles en la superficie sobre la que enlazarse [254]. Este efecto se ve aún más desfavorecido cuanto mayor es la longitud de la cadena unida al puente disulfuro [255], por lo que en el caso del ADN, este efecto no es despreciable y puede ser la causa más significativa que explique el diferente comportamiento entre las especies funcionalizadas con el grupo -SH y el -SS-.

Estas dificultades en la capacidad para quimiadsorber de las diferentes especies de ADN se reflejan también en el análisis cinético de sus respectivas inmovilizaciones, que se llevó a cabo en el biosensor nanomecánico, como se aprecia en la Figura R8, y donde se observa que la cinética de inmovilización del DNA-SH es superior a la de los correspondientes disulfidos.

Finalmente resulta de gran interés analizar los resultados de fluorescencia para la inmovilización de los tres tipos de ADN a tiempos largos y el efecto del MCH. En estos experimentos se ha analizado la señal fluorescente para los tres tipos de ADN modificados y para el ADN puramente fisiadsorbido (Figura R3b) a efectos comparativos. Se constata una señal diferente de fluorescencia para cada uno de ellos y de forma interesante, la señal debida a la fisiadsorción del ADN en oro parece ser baja en contradicción con las imágenes observadas por radiomarcage, mostradas en la Figura R1. De los tres tipos de modificación la mayor señal se obtiene para los ADN modificados con el grupo SH, seguido del DNA-SS-DMTO. Por el contrario, el DNA-SS-DNA, presenta una señal menor de fluorescencia.

Después del tratamiento con MCH la señal fluorescente disminuye en todos los casos como era de esperar, pero de forma sorprendente la señal correspondiente a la monocapa del DNA-SS-DNA aumenta de forma notable.

Los resultados de fluorescencia en oro deben evaluarse con cautela dado los efectos de extinción de la fluorescencia (o “quenching”) debidos al

oro. El oro inhibe la fluorescencia natural del fluoróforo haciendo que los fenómenos de relajación en éste tengan lugar por procesos no radiativos [256]. La magnitud de este fenómeno aumenta con la proximidad del fluoróforo a la superficie, según propusieron Chance y colaboradores en 1978 [257] y que posteriormente fue demostrado empíricamente [258]. Estas señales de fluorescencia no se pueden asociar únicamente al grado de recubrimiento generado por cada tipo de ADN modificado, ya que efectos como la organización de los ADN en la monocapa, así como su orientación respecto de la superficie pueden estar alterando la señal final obtenida. Los fenómenos de extinción de la fluorescencia se han usado por Rant y colaboradores [259] para evaluar los fenómenos de desorción de moléculas de ADN en electrodos de oro tras aplicar un potencial, con sólo seguir ese cambio de la fluorescencia con la distancia. Por tanto los datos de fluorescencia para ADN fisisorbido están proporcionando información principalmente de la geometría y orientación de los oligos, más que de la densidad superficial. Como en el trabajo de Rant y colaboradores, esta dependencia de la fluorescencia con la distancia del fluoróforo a la superficie, lejos de suponer un problema, puede ser útil para discernir otros aspectos importantes de la inmovilización y ser de gran utilidad cuando se contrasta dicha información con la generada por otras técnicas.

Las señales observadas serían el resultado de una mezcla de dos factores: la densidad superficial y la distancia del fluoróforo a la superficie. A su vez, la densidad superficial tiene un efecto directo en la distancia del fluoróforo a la superficie ya que en monocapas altamente empaquetadas las cadenas tienden a una configuración no totalmente vertical, sino ligeramente inclinada, debido a una interacción lateral entre cadenas que tiende a organizar la monocapa con las cadenas formando un ángulo sobre los 45°. Esta misma configuración inclinada se ha encontrado también en monocapas de ADN muy empaquetadas [260]. Por otra lado, los recubrimientos bajos favorecen que gran parte de las moléculas tengan parte de la cadena nucleótica en contacto con la superficie dejando el fluoróforo en una posición muy cercana a ésta. En cuanto al MCH, dado que actúa de espaciador lateral entre cadenas e impide que entren nuevamente en contacto con la superficie (Figura R9) cuanto mayor es la cantidad de espaciador incorporado, menos restringida está la molécula de ADN en su disposición tridimensional, físicamente está más alejada de otras moléculas de ADN vecinas, y más vertical es la configuración que puede adoptar. Por el contrario cuanto menor es la proporción de MCH incorporado como consecuencia de un mayor empaquetamiento, mayor es la tendencia esperada para el ADN para adoptar una configuración inclinada hacia los 45° [260, 261].

Es necesario enfatizar que los oligos de ADN de 12 bases poseen una longitud de unos 5 nm (4.3 Å/base) [262] y la longitud de persistencia del

ADN de cadena sencilla está entre 1-7 nm según el tampón empleado [263], por lo que la separación entre cadenas, cuando el MCH está muy incorporado en la monocapa, permite fácilmente que la cadena de ADN adopte una configuración en torno a los 90° [260, 263]. Dado que el efecto de extinción de la fluorescencia con la distancia es de un factor $1/d^5$ [257], cambios muy pequeños en la distancia (de tan sólo 1 nm) pueden suponer un cambio muy grande en la señal detectada, lo que explica el resultado obtenido para el DNA-SS-DNA y apoya el modelo sugerido.

En la Figura D3 se presenta un esquema que podría explicar los resultados de fluorescencia según estos criterios.

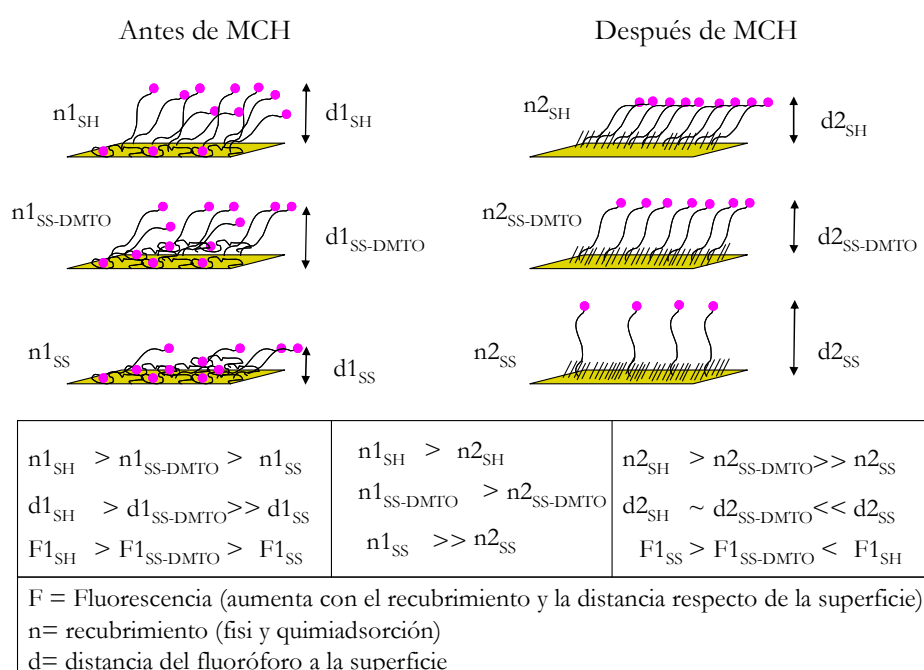


Figura D3. Esquema que muestra el modelo de lo que podría estar sucediendo en cada una de las monocapas de ADN estudiadas durante la inmovilización y el tratamiento con MCH y cómo esta configuración afecta a la señal fluorescente.

6.1.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE HIBRIDACIÓN. ACCESIBILIDAD DE LA SECUENCIA DIANA

Dado que la funcionalización SH es la que mejores resultados de quimiadsorción y de recubrimiento presenta se ha empleado esta funcionalización para optimizar las condiciones de detección en ambos dispositivos biosensores.

Empleando las mismas condiciones de inmovilización de 1 μM de oligo empleada para la caracterización anterior en SPR se constata que en estas condiciones es posible detectar la secuencia complementaria de 12 bases (Figura R9). La respuesta de hibridación es específica y muestra un límite de detección de 100 nM (Figura R10). Un análisis de la hibridación en función con la concentración permite estudiar la cinética de la hibridación. Tras el ajuste de los resultados de la Figura R10 a una isoterma de Langmuir se obtiene una constante de equilibrio $K=1.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, cuyo valor depende del número de enlaces G-C que existan, de la longitud de la cadena y del tampón utilizado. Un valor típico que puede calcularse, tanto con biosensores SPR como con biosensores nanomecánicos, es de $\sim 3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (para secuencias de 12-15 bases) [35, 264], pudiendo variar desde 10^5 a 10^9 dependiendo de la complementariedad de las cadenas [265]. Nuestros resultados demuestran que la cinética de hibridación está de acuerdo con los valores recogidos en la literatura.

En estas mismas condiciones, cuando realizamos el mismo experimento con biosensores nanomecánicos se constata que no es posible detectar con claridad la hibridación ni discriminar entre la secuencia complementaria y la no complementaria.

Experimentos realizados por otros autores tanto con SPR como con biosensores nanomecánicos y con diferentes técnicas de caracterización, han demostrado que la eficiencia de recubrimiento de la monocapa condiciona el grado de accesibilidad de la secuencia diana (Figura R12) lo que se refleja en la eficiencia de hibridación [35, 129-132, 136].

Los altos grados de empaquetamiento reflejan que a pesar de tener un gran número de moléculas capaces de participar en la hibridación, sólo un bajo porcentaje de ellas, un 10% [129], resultarán accesibles al complementario. El complementario deberá en ese caso vencer el fuerte impedimento estérico que supone introducirse en una monocapa muy compacta.

Para recubrimientos bajos muchos de los oligos pueden estar tumbados sobre la superficie en una geometría desfavorable para la hibridación. El caso óptimo sería aquél en el que todas las moléculas inmovilizadas tuvieran la capacidad de hibridar por estar separadas entre ellas la distancia suficiente como para permitir el acceso del oligo complementario minimizando los fenómenos de fisioadsorción.

Por este motivo, se ha analizado si es posible mejorar los resultados anteriores favoreciendo la accesibilidad de la secuencia complementaria.

Cuando se analiza la respuesta de hibridación del biosensor SPR en función de diferentes concentraciones de inmovilizado DNA-SH (Figura R13) se constata una disminución de la cinética de hibridación al disminuir la concentración de ADN inmovilizado, pero la señal neta para concentraciones $\geq 0.5 \mu\text{M}$ es equivalente en todos los casos. Esto se debe a que todas las

superficies están igualmente recubiertas para concentraciones $\geq 0.5 \mu\text{M}$ por lo que el porcentaje de las que hibridan es el mismo, mientras que para concentraciones menores, el recubrimiento no es total y la cantidad de cadenas que hibridan es también algo inferior. Según estos datos, la concentración 1 M empleada en nuestras medidas garantiza un máximo recubrimiento y un máximo en la señal de hibridación.

En estas condiciones si hacemos uso de un espaciador lateral como el MCH, se puede mejorar este valor de hibridación ya que esta estrategia disminuye la presencia de fenómenos de fisisorción y mantiene las cadenas de ADN levantadas y alejadas de la superficie por lo que mejora la accesibilidad de la secuencia diana [129-131].

El MCH se puede incorporar en una monocapa de dos formas:

i) creando una monocapa mixta *ab initio*, es decir, por coinmovilización simultánea de una relación concreta de ADN/MCH.

ii) por *post-inmovilización* del MCH tras la inmovilización previa del ADN sobre el oro.

Los resultados de la configuración *ab initio* (Figura R14a), muestran como el óptimo de hibridación es encontrado para una relación 1:0,6 μM de ADN:MCH. A medida que la cantidad de MCH incorporada en comparación con una cantidad fija de ADN aumenta, la señal de hibridación aumenta ligeramente, hasta que por encima de la relación 1:0,6 μM , la cantidad de MCH incorporada se hace excesiva y se reduce considerablemente el recubrimiento, por lo que la señal de hibridación detectada es muy inferior.

La adición del MCH *post-inmovilización* durante 1 h demuestra que la hibridación también se ve mejorada tras este tratamiento (Figura R14b). El nivel de fluorescencia detectado tras este tratamiento es muy similar al obtenido con la configuración *ab initio* para una relación 1:0,6. Esto indica que ambos protocolos son igualmente eficaces pero llevar a cabo un post-tratamiento es más sencillo que buscar la relación óptima de cada secuencia que se emplee, ya que la longitud y características propias de la secuencia inmovilizadas pueden imponer diferencias en la relación más idónea a emplear. Para cada tipo de secuencia empleada esta relación tendría que ser analizada y optimizada. Por ello, el tratamiento con MCH *post-inmovilización* del ADN será el protocolo que se utilice en adelante para la incorporación de este espaciador lateral.

En el biosensor SPR la incorporación del MCH a la monocapa de ADN también se refleja en un aumento en la señal de hibridación que se ve incrementada cuatro veces.

La accesibilidad vertical del complementario también se mejora si se consigue alejar respecto de la superficie la región destinada a la hibridación en la secuencia inmovilizada. Esto se puede llevar a cabo mediante el uso de una secuencia espaciadora de n nucleótidos entre el grupo mercapto y el primer nucleótido participe de la hibridación (Figura R17). Los experimentos

de hibridación por fluorescencia y radiomarcaje empleando secuencias con diferente longitud espaciadora (desde $n=0$ hasta $n=20$) muestran que existe una secuencia espaciadora óptima de 15 nucleótidos que favorece notablemente la hibridación y que tanto secuencias de menor como de mayor número de nucleótidos, generan menos eficiencia en términos de hibridación. Esto puede explicarse por un lado en términos de accesibilidad y, por otro, en términos de eficacia de recubrimiento. Estudios de la eficiencia de inmovilización en función de la longitud de la cadena de ADN inmovilizada revelan que cuanto mayor es la longitud de la misma, menor es la eficiencia del recubrimiento [132] debido al mayor volumen e impedimento estérico que reducen el número de moléculas capaces de acceder a la superficie y adsorberse. Así tenemos un doble efecto que compite para favorecer la señal de hibridación: al aumentar el tamaño de la secuencia se inmovilizan cadenas cada vez más largas que disminuyen la densidad de recubrimiento, pero al mismo tiempo aumenta el espaciado entre ellas y de la secuencia diana con respecto de la superficie. Por ello la accesibilidad del complementario se ve facilitada tanto lateral como verticalmente. Sin embargo sobrepasado un número de bases, por encima de 15 nucleótidos, los efectos en el descenso de recubrimiento empiezan a ser notables, por lo que la reducción del número de moléculas inmovilizadas redundará en una menor eficiencia en la hibridación de la monocapa. Este mismo efecto de mejora en la señal de hibridación con el uso de una secuencia vertical espaciadora se ha descrito en SPR [136] y en experimentos de detección de ADN en nanopartículas de oro [266].

En estos resultados puede descartarse la presencia de efectos de extinción de la fluorescencia o quenching durante el proceso de hibridación ya que los experimentos se han llevado a cabo usando una secuencia diana doblemente marcada con fluorescencia y ^{32}P y los resultados de radiomarcaje muestran una conclusión equivalente. Esto se debe probablemente a que las moléculas de ADN ven restringida de forma considerable su libertad de configuración tras la hibridación, adoptando una disposición más rígida y vertical que minimiza cualquier fenómeno de quenching.

En SPR la utilización de este espaciador vertical también se refleja en una mayor señal de la interacción con la secuencia complementaria, cuyo valor aumenta en torno a 1,2 veces.

En los biosensores nanomecánicos ni el uso de espaciadores laterales ni verticales se refleja en una mejora de la sensibilidad de la detección o en una mayor capacidad para discriminar entre secuencias complementarias y no complementarias, como demuestran las Figuras R16 y R19. Estos datos contrastan con los resultados de detección de ADN publicados por otros autores donde la detección de hibridación es posible e incluso es posible la detección de mutaciones [35, 47]. En todos estos trabajos se han empleado sistemas referenciados en los que la señal de hibridación sólo era posible

detectarla por medio de una sustracción de la misma respecto de la producida por otra micropalanca funcionalizada con una secuencia de ADN no complementaria a la secuencia diana. Nuestros resultados demuestran que la detección de ADN no es posible si se emplea un sistema de una única micropalanca [82]. Una explicación posible de estos resultados sería que los protocolos de hibridación empleados aunque garantizan una hibridación óptima, no garantizan unas condiciones en las que los efectos de tensión superficial debidos al proceso de hibridación sean también maximizados. Las fuerzas que entran en juego durante los procesos de hibridación y que por tanto pueden producir un cambio de tensión superficial y una deflexión, pueden ser debidas a la interacción entre cadenas por impedimento estérico, por fuerzas electrostáticas, por fuerzas de hidratación y/o al cambio de configuración del ADN al hibridar. La magnitud de estas fuerzas está directamente relacionada con el recubrimiento de ADN. Se puede suponer que para el recubrimiento de ADN inmovilizado que se obtiene en nuestros experimentos, la principal fuente de tensión superficial en el proceso de inmovilización es el enlace entre el oro y grupo mercapto de las sondas de ADN, con una leve contribución debida a la adsorción física de los nucleótidos sobre el oro. En esta situación las fuerzas intermoleculares, principalmente las fuerzas de hidratación y electrostáticas que surgen como consecuencia de la hibridación [35, 267] producirían un cambio de tensión superficial que, o bien se encuentra por debajo del límite de detección de nuestro sistema, o bien por su pequeña magnitud queda enmascarado por otros efectos que pueden cursar con un cambio de tensión en la micropalanca, tales como pequeñas variaciones en el pH, la fuerza iónica o la temperatura [35, 82]. Estos efectos podrían ser sustraídos con el uso de una micropalanca de referencia.

Para estudiar si los efectos de fisiadsorción tanto en el oro como en el lado del nitruro pueden estar actuando en la micropalanca enmascarando las posibles señales de hibridación se ha analizado:

i) la tensión superficial generada por moléculas de ADN no funcionalizada como consecuencia de su fisiadsorción sobre el oro.

ii) la tensión superficial generada por moléculas de ADN funcionalizadas y sin funcionalizar sobre el lado de nitruro de silicio. Para ello se ha inactivado la reactividad del oro funcionalizando dicha superficie con MCH, de modo que las cadenas de ADN no puedan adsorberse sobre dicha superficie.

Los resultados del primer punto se muestran en la Figura R8. Puede observarse como la fisiadsorción del ADN genera una respuesta positiva de tensión superficial aunque de magnitud muy pequeña en comparación con la del ADN funcionalizado, por lo que la existencia de eventos de fisiadsorción podrían ser uno de los factores que enmascaren la señal de hibridación.

En cuanto a la fisisorción en nitruro, la Figura R7 muestra que tanto el efecto de la fisisorción como de la quimiadsorción en esta superficie son despreciables. Así pues pueden excluirse como factores que puedan participar en la respuesta de tensión superficial de la micropalanca.

6.2 Selección de un sistema biosensor para la detección de mutaciones

En un dispositivo biosensor el proceso de reconocimiento molecular debe poder transducirse en una señal que sea proporcional a la cantidad del analito que se quiere detectar. En los biosensores tipo SPR el principio de detección se basa en la medida del cambio de índice de refracción que se produce como consecuencia del aumento de masa asociado al reconocimiento del analito. Esto conlleva que el proceso de transducción esté de forma inequívoca ligado a la cantidad de analito que se está detectando.

En los biosensores nanomecánicos el proceso de transducción se debe a un cambio de tensión superficial, el cual no está directamente ligado a una variación de masa como consecuencia del reconocimiento, sino a un complejo fenómeno de interacciones. La generación de tensión superficial se debe a un conjunto de fuerzas y fenómenos que aún resultan desconocidos [82]. Por ello, se constata que la sensibilidad de esta técnica depende en gran medida de la naturaleza de las moléculas que estén interaccionando. Analitos como proteínas o incluso pequeños compuestos inorgánicos o volátiles se pueden detectar con elevada sensibilidad, incluso en sistemas de una única micropalanca [79], mientras que durante la hibridación de ADN se genera un cambio de tensión superficial muy bajo que complica en extremo su detección, especialmente en sistemas de una única micropalanca.

En la literatura se encuentran un reducido número de trabajos que hayan demostrado la viabilidad de los biosensores nanomecánicos para detectar hibridación de ADN e incluso mutaciones [35, 47, 76], pero requieren de sistemas referenciados para poder aislar la deflexión de la micropalanca debida al evento de hibridación de otros fenómenos ajenos al proceso de reconocimiento y que pueden contribuir a la deflexión.

Las dificultades en la medida con micropalancas son las responsables de que a excepción del trabajo de Mckendry y colaboradores [35] todas las demás publicaciones muestran únicamente medidas puntuales sin que ninguna de ellas haya demostrado la validez de esta técnica biosensora en términos de reproducibilidad. En ningún trabajo se ha publicado una curva de calibrado de la señal de deflexión en función de la concentración, ni estudios que reflejen las variables más importantes que afectan a la señal de hibridación en estos dispositivos ni una caracterización analítica de los mismos. El trabajo de Mckendry y colaboradores muestra un estudio de la respuesta de la micropalanca frente a la concentración de la secuencia diana

alcanzando un límite de detección 75 nM y la posibilidad de detectar mutaciones para secuencias 200nM. Es el trabajo que mejores límites de sensibilidad presenta, frente a otros que detectan secuencias complementarias del orden micromolar [76].

Desde el punto de vista teórico, los dispositivos nanomecánicos poseen una elevada sensibilidad, cerca de un orden de magnitud superior a la del SPR, siendo capaces de detectar cambios en la tensión superficial de $\approx 10^{-4}$ Nm⁻¹ [45]. A pesar ello, el límite de detección de 75 nM de los biosensores nanomecánicos no consigue superar el límite hasta ahora demostrado por el biosensor SPR, que se sitúa en 50 nM[28]. Este hecho confirma que los biosensores nanomecánicos encuentran serias dificultades para transducir el evento de hibridación en una señal de tensión superficial apreciable, lo que reduce su sensibilidad.

En nuestros experimentos, la detección de hibridación en SPR se ha logrado alcanzar con límites de detección aún más bajos que los hasta ahora reflejados en la literatura, demostrando que los protocolos que se han desarrollado para optimizar la reacción de hibridación durante este trabajo de Tesis han permitido crear monocapas de ADN altamente eficientes para la hibridación.

En este trabajo de Tesis se ha demostrado para secuencias de 12 y 25 bases de longitud, un límite de detección de 100 nM y 10 nM, respectivamente. Sin embargo, empleando una única micropalanca la detección de ADN no se puede identificar a pesar de llevar a cabo la reacción de hibridación en las mismas condiciones que en el biosensor de SPR. Esto indica que la hibridación está teniendo lugar en la superficie de la micropalanca pero que el sistema biosensor no tiene capacidad para transducirlo en una señal de deflexión apreciable.

Es de destacar también que los límites de detección obtenidos mediante el biosensor SPR provienen de la medida directa de la interacción sin necesidad de usar una medida de referencia simultánea, como sí parece ser requisito imprescindible para el biosensor nanomecánico.

Dado que el biosensor SPR ha demostrado una mayor capacidad para detectar la hibridación de ADN, se ha elegido este dispositivo para el desarrollo de una metodología que permita detectar mutaciones y que pueda ser aplicado a la detección de cáncer de mama heredado.

6.3 Optimización de condiciones de detección de mutaciones

6.3.1 DETECCIÓN DE DESAJUSTES DE UNA SOLA BASE

Se ha demostrado la posibilidad de alcanzar un límite de detección de hibridación de 10 nM empleando condiciones de alta fuerza iónica. En este

medio la hibridación está tan favorecida que la diferenciación de la secuencia complementaria de la portadora de un desajuste no es posible. Por este motivo se han estudiado otras condiciones de detección más astringentes que limiten la hibridación de la secuencia mutante respecto de la perfectamente complementaria, haciendo uso de diferentes tampones de hibridación con fuerza iónica decreciente. Los experimentos han demostrado que para diferentes condiciones de fuerza iónica a medida que ésta se reduce, la señal de hibridación disminuye y con el buffer SSC 1X es posible identificar la secuencia mutante de la salvaje (Figura R21).

La curva de calibrado de la secuencia complementaria y las portadoras de un desajuste interno o externo, mostradas en la Figura R20, demuestran que estas condiciones son óptimas para detectar mutaciones con un buen nivel de discriminación. Sin embargo debido a que trabajar en SSC 1X implica condiciones de mayor astringencia que en las condiciones ideales de PB 50 mM – NaCl 1 M, el límite de detección ha empeorado sensiblemente (de 10 nM a 100 nM).

En cuanto a la capacidad de discriminación entre mutaciones internas o externas, aunque se observan ciertas diferencias entre ambas éstas no se pueden considerar significativas y resulta complejo establecer una diferenciación clara con la medida de los dispositivos biosensores.

En la literatura los trabajos más significativos en detección directa de ADN con SPR han sido los desarrollados por:

- i) El grupo de Gambari y colaboradores para detección de mutaciones vinculadas en la fibrosis quística, β -thalasemia y organismos genéticamente modificados [30, 34, 88-91]; empleando concentraciones de complementario por encima de 1 μ M.
- i) El grupo de Mascini y colaboradores [28, 268, 269] que detectan mutaciones en el gen TP53 con límites de detección de 50 nM para secuencias de la misma longitud que las empleadas en este trabajo y 150 nM para productos de PCR [28].
- ii) El grupo de Nygren [92] que detectan mutaciones en el gen p53, que emplea concentraciones de 2 μ M para detección de oligos de corta longitud y de 200 nM para detección de productos de PCR.

Para secuencias de longitud semejantes a las nuestras el mejor límite de detección publicado es del orden de 50 nM pero en esas condiciones la discriminación de mutaciones sólo se consigue para concentraciones por encima de 1 μ M [28].

Por ello a pesar de esta pérdida de sensibilidad en las condiciones seleccionadas para la detección de mutaciones, el límite de detección de 100

nM que hemos demostrado es muy superior en cuanto a grado de detección y discriminación de mutaciones, suponiendo una mejora sustancial respecto de lo hasta ahora publicado en la literatura.

6.3.2 DETECCIÓN DE MUTACIONES EN PRODUCTOS TIPO PCR

La detección de mutaciones en muestras reales implica la detección del producto de PCR o amplicón generado a partir del ADN genómico de pacientes afectados de cáncer de mama.

Los productos de PCR son mucho más largos en comparación con los sistemas de 12 y 25 bases analizados. El aumento en el peso molecular que representa usar estas secuencias favorece la sensibilidad de la detección. Por el contrario su mayor volumen y las posibles estructuras secundarias que pueda presentar hacen predecir una menor eficiencia en la hibridación por la aparición de problemas estéricos, en comparación con secuencias más cortas. Además los productos de PCR obtenidos de muestras reales constituyen en si mismos una muestra mucho más compleja que los oligos de 25 bases medidos hasta ahora. Aparte de las diferencias en longitud los efectos debidos a los procesos preparativos pueden ejercer un factor de interferencia cuando se desarrolla la hibridación en el biosensor.

Existen dos estrategias de detección posibles para productos de PCR (Figura D4):

- i) **Formato I:** Inmovilización del producto de PCR e identificación empleando secuencias cortas sintéticas que hibriden con la región central correspondiente [88, 92].
- ii) **Formato II:** Inmovilización de la secuencia de corto tamaño y detección de la mutación en el producto de PCR en el medio de reacción [28, 92].

Ambos formatos han sido demostrados con éxito por Nilsson y colaboradores para la identificación de mutaciones en el gen p53 de muestras procedentes de biopsia de tejido con cáncer de mama [92].

El primero de los dos formatos requiere de la introducción de algún tipo de modificación (ej. una biotina) en los cebadores que se emplean en la PCR que permita generar un producto capaz de anclarse a la superficie. De esta forma se logra también una manera de identificar y separar la hebra Fw de la Rv dentro del producto de PCR, inmovilizando sólo la hebra de interés. Con el formato II la identificación y separación de la hebra Fw y Rv es más compleja y puede suponer un verdadero problema para que la hebra de interés hibride con la secuencia inmovilizada y no con su amplicón complementario.

Este formato presenta también la ventaja de que la señal de hibridación no está limitada por la concentración de complementario. Las sondas de pequeño tamaño empleadas para la detección al provenir de muestras sintéticas se pueden usar en concentración micromolar para garantizar la máxima señal de hibridación. Pero es necesaria una considerable concentración del producto de PCR para su inmovilización lo que limita su operatividad. El hecho de tener que inmovilizar productos de tamaño tan elevado conlleva que las monocapas generadas tengan bajas eficiencias de inmovilización y en consecuencia bajos recubrimientos.

Por extensión, los ensayos pierden la capacidad de uso para medir diferentes muestras a lo largo del tiempo con una misma monocapa, ya que sería necesaria la inmovilización cada vez de la muestra correspondiente a cada paciente, lo que resta aplicabilidad e interés desde un punto de vista de la detección y diagnóstico clínico.

Para la detección por SPR, dado que el cambio de índice de refracción registrado está directamente relacionado con cambio de masa producido por la unión de la secuencia complementaria, el formato I supone una desventaja en términos de sensibilidad frente al formato opuesto.

En el formato I se detectan sondas de pequeño tamaño y se emplean productos de gran tamaño, como es el producto de PCR, para la inmovilización. La inmovilización de cadenas largas de ADN ha demostrado generar monocapas menos densas y menos eficaces para la hibridación [132].

Estos dos factores conjuntamente conllevan que este formato genere peores límites de detección. Presenta además, serias desventajas para su extensión a formatos de tipo multianálisis, ya que sólo en casos en los que el producto de PCR presente varias mutaciones en posiciones muy próximas dentro del amplicón sería posible desarrollar la multidetección [88].

Por el contrario, el formato opuesto (formato II), al trabajar de modo inverso permite que la inmovilización sea eficiente generando monocapas con altos recubrimientos y aprovecha el empleo de una sonda de mayor tamaño para llevar a cabo la detección. Este formato, además permite el desarrollo de ensayos multianálisis por co-inmovilización de diferentes secuencias de ADN.

En este caso, la misma monocapa puede usarse por un número elevado de ciclos para detectar muestras de diversos pacientes, reduciendo la laboriosidad de la detección y facilitando de forma notable su uso por parte de personal no cualificado.

Por estos motivos se ha escogido el segundo de los formatos planteados para llevar a cabo el desarrollo de nuestra aplicación.

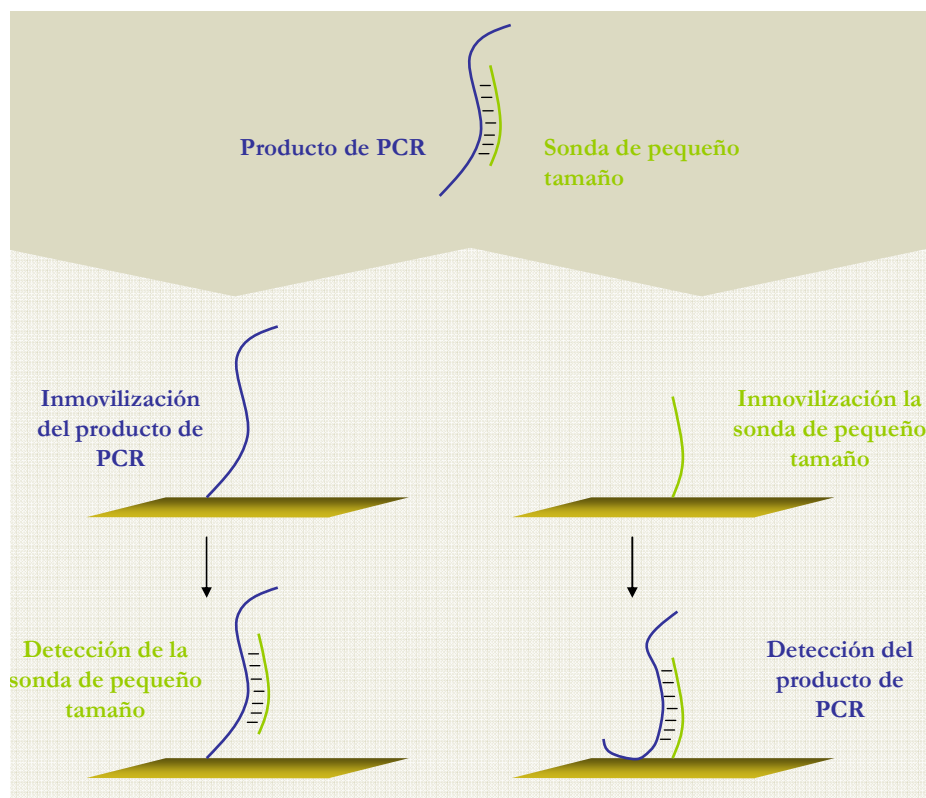


Figura D4. Principales estrategias para la detección de productos de PCR en biosensores de ADN. **(izda.)** Inmovilizando el producto de PCR y detectando la secuencia por medio de una sonda de pequeño tamaño. **(dcha.)** Inmovilizando una sonda de pequeño tamaño y detectando el producto de PCR por hibridación con la misma.

Este formato se ha probado en primer lugar con sondas sintéticas idénticas a las del amplicón que se obtendría de la PCR de las muestras reales. Optimizar con secuencias *tipo PCR* en lugar de con el producto real obtenido a partir del ADN de pacientes, permite poner a punto un protocolo de detección en la que se eliminan interferencias provenientes de la etapa preparativa de las muestras reales, agilizando y facilitando dicha optimización.

La Figura R23 muestra la curva de calibrado de SPR en función de la concentración de ADN detectado para la secuencia 916delT^T, para el fenotipo salvaje y el mutante. Se han empleado las mismas condiciones de hibridación que para la secuencia de 25 mer.

Como se puede observar para la secuencia *tipo PCR* se alcanza el mismo límite de detección de 100 nM, que para la secuencia de 25 mer aunque la capacidad de discriminación entre ambos fenotipos es muy superior en el

caso de la secuencia *tipo* PCR. Este elevado grado de discriminación ha sido constatado también por radiomarcaje como muestra la Figura R24 donde la detección del fenotipo mutante es posible incluso en un exceso de 10 veces la secuencia del fenotipo salvaje.

Para esta secuencia tipo PCR se ha estudiado el efecto del tratamiento con MCH para analizar si el uso de este espaciador podría suponer una mejora o no con respecto a la señal de hibridación en ausencia del mismo. Como se muestra en la Figura R23 para la secuencia *tipo* PCR en ambas condiciones se obtiene el mismo límite de detección aunque se obtiene una mejor diferenciación entre concentraciones en la monocapa no tratada con MCH ya que las señales son ligeramente superiores. Este hecho pone de manifiesto un aspecto a destacar en cuanto al uso de espaciadores: la necesidad de tener en cuenta la longitud y tamaño de la muestra a detectar.

El MCH ha demostrado tener un importante papel en la mejora de la hibridación para detección de secuencias de ADN de corta longitud, sin embargo, cuando se pretende detectar secuencias más grandes como son los productos de PCR el efecto es inverso. El aumento del espaciado entre cadenas inmovilizadas mediante la incorporación de MCH para mejorar la accesibilidad implica al mismo tiempo una importante pérdida de recubrimiento que disminuye la eficiencia de la hibridación. Dado que por su mayor tamaño el producto de PCR presenta mayor impedimento estérico y menor eficiencia de hibridación en comparación con secuencias más cortas, la reducción en número de secuencias inmovilizadas que implica el uso del MCH representa un factor que compite de forma negativa frente al beneficio de usarlo para reducir efectos de fisisorción y reorganización de la monocapa (Figura R22). La ventaja en cuanto a accesibilidad que proporciona el uso del espaciador lateral no es suficiente para mantener una buena señal de hibridación, convirtiéndose el MCH en un factor negativo. Resulta por tanto, más apropiado no usar espaciador lateral o bien buscar una molécula de diferente naturaleza que no afecte de manera tan importante al recubrimiento como sería el uso de alcanotioles de mayor longitud [135].

Para la ampliación de la detección de este formato a uno multianalito se ha optado por esta segunda opción y que sean las propias cadenas de ADN de la/s otra/s secuencias co-inmovilizadas las que actúen como espaciadores laterales favoreciendo la accesibilidad de la secuencia diana. Para ello es clave encontrar la relación de concentración de secuencias co-inmovilizadas que maximiza la detección de todas ellas en magnitud similar consiguiendo además un buen grado de discriminación entre fenotipos.

En primer lugar se ha probado para las secuencias 916delTT y 185delAG una relación 2:2 μM . La Figura R25 muestra la señal de hibridación 500 nM donde la discriminación entre secuencias de fenotipos mutante y salvaje es posible, pero tanto la magnitud de las señales como el grado de diferenciación es bajo. El aspecto más negativo es sin embargo, la

elevada señal encontrada para el fenotipo salvaje. En nuestros experimentos interesa que la señal del fenotipo salvaje sea la mínima posible para minimizar posibles errores de detección. El formato ideal es aquel en el que sólo el mutante es capaz de dar señal apreciable. Esto nos ha llevado, como se detalla en la sección de resultados, a definir los límites de detección que garantizan una identificación fiable del fenotipo mutante. Para ello hemos considerado de forma empírica que haya una diferencia (ΔZ) entre las señales de las secuencias de ambos fenotipos de, al menos, 0,1 unidades de resonancia. Éste es el valor mínimo que permite identificar sin error un fenotipo, en base a la diferencia en magnitud entre sus respectivas señales. Además hemos establecido que el evento de hibridación del fenotipo mutante sea superior a 0,1 unidades de resonancia respecto de la línea base. y que durante la detección la señal de fenotipo salvaje debe sea minimizada en la medida de lo posible.

Con los criterios anteriores se procedió a probar otras condiciones de hibridación que aumenten la capacidad de discriminación empleando formamida. La formamida actúa inhibiendo la formación de enlaces de hidrógeno entre bases por lo que dificulta la hibridación de secuencias que no sean perfectamente complementarias aumentando la especificidad.

El resultado tras emplear formamida en el tampón de hibridación es una notable mejora en la capacidad de discriminación a un porcentaje del 5% en SSC 5X. En estas condiciones se mantiene una señal clara de fenotipo mutante, mientras la del fenotipo salvaje es muy pequeña. Particularmente se ha mejorado la señal de la secuencia 185delAG en la que previamente la señal del fenotipo salvaje era muy alta.

Durante los experimentos se observó que .escasa reproducibilidad en las medidas lo que conllevaba diferencias sustanciales en las señales de hibridación para diferentes inmovilizaciones. Por este motivo se optó por desarrollar la inmovilización de forma ex-situ.

En las monocapas mixtas de ADN que queremos desarrollar es imprescindible conseguir una buena reproducibilidad. Es preciso que la organización y distribución de las cadenas de ADN sea siempre igual en todas las inmovilizaciones que se realicen para una relación de concentraciones dada.

En los experimentos de caracterización se ha observado que para el DNA-SH el efecto del tiempo implica una mejora en el recubrimiento y en la organización de la monocapa. La inmovilización en flujo conlleva que el tiempo que la muestra de ADN está en contacto con el oro sea en general bajo y al tener lugar en flujo las moléculas inmovilizadas no siempre se distribuyan en la superficie del mismo modo. Pequeñas variaciones en el sellado de la celda o en el flujo pueden inducir que la monocapa no se reorganice de la misma forma en cada experimento y que por tanto no responda con la misma eficiencia.

En nuestros experimentos la reproducibilidad de la detección se consigue realizando la inmovilización ex-situ durante un período de 3 h.

Por otra parte, la regeneración también debe optimizarse al máximo, de forma que la monocapa inmovilizada soporte el mayor número de ciclos posible sin perder sus propiedades y muestre así una alta durabilidad. Se han probado tres soluciones de regeneración diferentes: NaOH 0,2 M, HCl 5 mM y Formamida 35%. Con las dos primeras la durabilidad de la monocapa era baja y por encima de unos 15 ciclos la eficiencia decaía de forma notable.

Al usar formamida 35% se obtiene un alto poder regenerador, al tiempo que la monocapa gana en durabilidad soportando al menos cuarenta ciclos sin perder sus propiedades (Figura R27). Esta condición se eligió como la óptima para este formato.

El resultado de estas optimizaciones en la monocapa mixta 916delTT-185delAG se muestra en la curva de calibrado de la Figura R28. Para ambas secuencias la diferenciación entre fenotipos es clara y el límite de detección ha mejorado respecto del formato unianalito, siendo ahora de 50 nM. Este dato demuestra que el efecto espaciador que unas cadenas ejercen sobre las otras por estar en una monocapa mixta es muy importante y en nuestro desarrollo demuestra un papel clave encontrar la relación que maximiza la detección y la discriminación.

En esta monocapa se puede apreciar a partir de la curva de calibrado que para el 185delTT aunque la señal de discriminación es clara no es tan evidente como en el caso del 916delTT. En esta muestra los fenotipos se diferencian en sus respectivas señales en cerca de 0,4 unidades. En cambio el 185delAG sólo permite una discriminación de 0,15 unidades (Figura R29).

Se probaron otras relaciones de concentraciones para ver si ese valor de discriminación podía aumentarse y se encontró que en la relación 2:3 μM la discriminación pasa a cerca de 0,4 unidades para una concentración de hibridación de 125 nM. Sin embargo en esta condición la señal del fenotipo es muy elevada y el uso de formamida a un porcentaje superior, del 25%, permite mantener el anterior valor de discriminación pero con una señal del fenotipo salvaje mínima.

De forma análoga se optimizó el formato multianalito para las otras dos secuencias, la R1443X y la 5382insC. La mejor relación de concentraciones encontrada para ambos fue de 1:0,5 en SSC5X-formamida 5%. Igual que en el caso anterior para una secuencia 125 nM se obtiene una señal amplia al tiempo que se consigue suficiente poder de discriminación (Figura R27).

Los resultados que demuestran la sensibilidad y capacidad de discriminación entre los dos fenotipos se pueden observar en la curva de calibrado de la Figura R28. Los límites de detección para cualquiera de las secuencias están por debajo de 50 nM, entre 20-30 nM, ya que para 50 nM las señales del fenotipo mutante son en magnitud muy superiores al límite de

$\Delta Z=0,1$ impuesto en las condiciones de sensibilidad establecidas en nuestros experimentos. Además por debajo de 50 nM la respuesta del fenotipo salvaje es nula en ambas secuencias, por lo que por debajo de esa concentración cualquier señal que se obtuviera se podría asociar de forma inequívoca al fenotipo mutante. Por tanto se podría flexibilizar la condición de sensibilidad y aceptar señales por debajo de 0,1 de magnitud. Este dato constituye un excelente resultado en detección directa de ADN por SPR, que es muy inferior a los niveles publicados hasta la actualidad con esta técnica (Figuras R28 y R29).

Finalmente hemos explorado la viabilidad de extender este formato a un multianálisis de cuatro secuencias. Del mismo modo que previamente la inmovilización se ha llevado a cabo *ex-situ* y se ha mantenido un tampón de hibridación de SSC-5X con 5% de formamida, excepto para 185delAG, que se empleó un porcentaje del 20%. Tras evaluar las relaciones de concentraciones para 916delTT:185delAG:R1443X:5382insC: 1:1:1:1; 0.5:1:1:0.5 y 2:1:1:2 μM , se escogió la relación de concentración 2:1:1:2 μM (figura R34). Con estas condiciones se llevó a cabo la hibridación de una secuencia 125 nM para ambos fenotipos (Figura R35). El resultado por triplicado muestra la excelente reproducibilidad y poder de discriminación que se mantiene a pesar de haber ampliado el formato en número de secuencias al doble. Salvo la secuencia R1443X que presenta una señal ligeramente inferior, todas las secuencias dan valores de señal de hibridación muy similares con la ventaja de que la señal debida al fenotipo salvaje es prácticamente nula en todos los casos.

Las curvas demuestran que se consigue un altísimo nivel de discriminación en todos los casos, muy superior al que se tenía en el formato de dos secuencias, con una diferencia de señales $\Delta Z \sim 0,4$. Esto indica que este formato de monocapa permite un mayor grado de accesibilidad de la secuencia complementaria, dado que unas secuencias actúan de espaciadoras de las otras. Asimismo, se ha conseguido aumentar la magnitud de la señal en comparación con el formato de dos secuencias, indicando que además de mejorar la capacidad de discriminación, se ha mejorado la sensibilidad con respecto al formato anterior.

En consecuencia este formato no sólo mantiene las ventajas anteriores para la co-detección de dos secuencias si no que presenta respuestas mejoradas con la ventaja añadida de permitir la detección múltiple de cuatro secuencias.

6.4 Importancia del desarrollo de un formato multianalito con biosensores SPR para la detección de mutaciones en el ADN

La detección de mutaciones en el campo de la biotecnología para su uso en diversas aplicaciones tiene un interés innegable lo que hace que cada vez se realicen más esfuerzos por mejorar y optimizar las técnicas actuales.

Frente a éstas, los biosensores pueden presentarse como una excelente alternativa a las técnicas convencionales, permitiendo evaluar la hibridación en tiempo real y sin necesidad de marcajes.

Estos dispositivos parten con la desventaja de que la reacción de hibridación no se realiza en disolución sino en fase sólida lo que dificulta la hibridación debido a la menor libertad configuracional de las moléculas. Este formato requiere de la inmovilización previa de una de las hebras en la superficie del transductor, lo que implica el esfuerzo de desarrollar una química optimizada de funcionalización que permita maximizar la reacción de hibridación. Esta desventaja inicial se ve compensada en gran medida por la alta sensibilidad que ofrecen los dispositivos biosensores, permitiendo además monitorizar en pocos minutos y en tiempo real la reacción de hibridación. Esta química de inmovilización una vez desarrollada es fácilmente estandarizable para cualquier tipo de secuencia nucleotídica.

La dificultad de tener que realizar la hibridación en fase sólida puede transformarse en una ventaja real dado que la accesibilidad puede constituir por sí misma un parámetro de control sobre el proceso de hibridación y discriminación entre secuencias. El control de la accesibilidad y los factores estéricos que tienen lugar pueden permitir aumentar la discriminación entre secuencias complementarias respecto de una no complementaria y minimizar los procesos inespecíficos de la misma forma que lo hacen factores como la temperatura, la polaridad o la astringencia del medio de hibridación.

Nuestros resultados demuestran como el control de la accesibilidad y el uso de monocapas mixtas en las que unas secuencias nucleotídicas actúan de espaciadoras de las otras, conlleva una mejora notable en la sensibilidad alcanzada.

Por otra parte el hecho de poder evitar marcajes y reacciones de amplificación de la señal conlleva una reducción muy importante de tiempo y coste, así como la reducción de errores que pudieran derivarse de estas reacciones. La lectura directa del proceso de hibridación para detectar mutaciones puntuales resulta por ahora complejo debido al pequeño cambio que implica un simple desajuste de la secuencia nucleotídica para el sistema transductor. Por ello, en la mayor parte de los trabajos de la literatura, se ha recurrido al uso de elementos mediadores o amplificadores que permitan magnificar la diferencia entre una secuencia completamente complementaria de una que no lo sea.

En biosensores de resonancia superficial el objetivo de alcanzar la lectura directa sin marcajes constituye en sí mismo un autentico reto y, como ya se ha comentado con anterioridad, son realmente muy escasos los trabajos al respecto que se pueden encontrar en la literatura. En cuanto a detección en formato multianalito, solamente existe un trabajo que permite la detección múltiple de varias secuencias.

En este trabajo de Tesis se ha desarrollado un formato de detección multianalito que presenta excelentes resultados en cuanto a sensibilidad y capacidad discriminatoria entre dos fenotipos con diferencias en una mutación. Este tipo de formato es además único y no se ha desarrollado con anterioridad en la literatura, ni para la detección de dos secuencias, ni para el caso de cuatro.

Para una lectura de la hibridación de forma directa sólo existe, hasta donde conocemos, un único ejemplo que ha sido desarrollado por el grupo de Bambari [88] también con la técnica de SPR, y relacionado con la detección de mutaciones vinculadas a la β -Thalasemia. En este trabajo la estrategia de detección fue la inmovilización de 1 μ g de producto de PCR de 232 pb (\sim 325 nM) biotinilado, que, en sí mismo, poseía cuatro dianas susceptibles de estar mutadas. La detección de la presencia de la mutación se llevo a cabo por la hibridación de la monocapa portadora del producto de PCR inmovilizado en la superficie sensora con una sonda sintética de 11-12 pares de bases. Como ya se ha indicado, el formato de inmovilización del producto de PCR presenta serias desventajas frente al de inmovilización de una secuencia corta y detección del amplicón de PCR. Comparando este trabajo con el desarrollado en esta Tesis, nuestra propuesta presenta una mejor sensibilidad ya que podemos trabajar con productos de PCR en concentración del orden de 50 nM, mientras que el formato inverso, requiere de concentraciones de producto de PCR muy superiores del orden de 320 nM.

Finalmente nuestra propuesta presenta la ventaja de no perder la capacidad de uso para medir diferentes muestras a lo largo del tiempo con una misma monocapa. La misma monocapa puede ser regenerada durante numerosos ciclos sin perder eficiencia de hibridación. Por el contrario en el otro formato sería necesaria una nueva inmovilización de la muestra correspondiente a cada paciente lo que resta aplicabilidad e interés desde un punto de vista de la detección y diagnóstico clínico.

Por todo ello el sistema de detección de múltiples secuencias que se ha demostrado constituye, en sí mismo, un hito en la detección de ADN por lectura directa mediante biosensores ópticos.



CONCLUSIONES

El objetivo de esta Tesis doctoral ha consistido en validar los dispositivos biosensores, concretamente los nanomecánicos y los de resonancia de plasmón superficial, para su aplicación en la detección de mutaciones en el gen BRCA1 vinculadas con el cáncer de mama hereditario.

Las técnicas convencionales de detección de mutaciones de rutina constituyen un proceso largo, laborioso y complejo. Por ello, estos dispositivos han de demostrar su capacidad de detección ADN en tiempo real y sin necesidad de marcajes. Al mismo tiempo la detección debe poder llevarse a cabo a partir de productos de PCR dentro de unos niveles de sensibilidad compatibles con dicha técnica y permitir la detección en formato multianálito para poder analizar múltiples mutaciones.

Para la consecución de este objetivo, este trabajo de Tesis ha desarrollado los siguientes aspectos:

- *Optimizar la inmovilización del ADN en oro en ambas plataformas biosensoras* empleando la química de las monocapas autoensambladas con secuencias de ADN funcionalizadas con un grupo mercapto. Para la consecución de este objetivo se han realizado experimentos que han permitido elegir, de entre tres funcionalizaciones mercapto diferentes, la $-SH$, como la que mejores monocapas de ADN generaba. Esta funcionalización es, en términos de densidad de moléculas y de efectividad en la quimiadsorción, la que mejor ha conseguido crear monocapas de ADN altamente empaquetadas minimizando los fenómenos de fisiadsorción.

- *Optimizar la hibridación de secuencias cortas de ADN en ambas plataformas biosensoras.* Se han desarrollado experimentos para demostrar la viabilidad de ambos dispositivos para detectar secuencias cortas de ADN por hibridación. De las dos plataformas, únicamente la SPR ha demostrado su eficiencia en la detección de estas secuencias, presentando un límite de 100 nM, que es inferior a lo publicado para secuencias de esta longitud. Los biosensores nanomecánicos presentaron serias dificultades para detectar la hibridación y sus señales no se diferencian de la de una secuencia control no complementaria. Se ha hecho uso de diferentes estrategias para mejorar la señal de hibridación en ambos dispositivos mediante el uso de espaciadores laterales y verticales. En el biosensor SPR, esta estrategia mejora notablemente la accesibilidad de la secuencia complementaria lo que se

traduce en señales de hibridación muy superiores. Empleando estas condiciones con secuencias de 25 bases el límite de detección pasa a 10 nM, lo que representa un importante logro en sensibilidad con estos dispositivos. En el biosensor nanomecánico, sin embargo, ninguna de estas dos opciones supone una mejora de la señal de hibridación.

- *Selección del dispositivo biosensor SPR como el más adecuado para detección de ADN:* De los experimentos anteriores se ha demostrado la incapacidad de los biosensores nanomecánicos para detectar hibridación de ADN usando una única micropalanca. Se ha demostrado que estas medidas sólo pueden llevarse a cabo haciendo uso de medidas referenciadas y desarrollando plataformas de mejores prestaciones en sensibilidad, lo que constituirá una de nuestras líneas futuras de investigación, como se desarrolla en la sección de Líneas futuras.

El biosensor SPR ha demostrado su sensibilidad y capacidad en la detección de secuencias de corta longitud, 12 y 25 bases, con excelentes límites de sensibilidad, 100 y 10 nM, demostrando que esta técnica es excelente para la detección de ADN y superando los valores publicados en la literatura para secuencias de este tipo con estos biosensores. Además estos valores suponen también una mejora en el límite de 75 nM que presentan los biosensores nanomecánicos usando micropalancas de referencia. Por este motivo este biosensor fue seleccionado como la mejor plataforma biosensora para llevar a cabo detección de ADN.

- *Optimización de la detección de ADN en SPR para permitir la detección de mutaciones:* Se han seleccionado de entre diferentes condiciones de hibridación las que permiten discriminar mutaciones. Se ha demostrado que en SSC 1X, es posible identificar tanto mutaciones internas como externas en la detección de secuencias 25 mer. El límite de detección en estas condiciones es 100 nM.

- *Detección de productos tipo PCR del gen BRCA1*

i) *con formato uni-analito:* Se ha puesto a punto la metodología para detectar secuencias tipo PCR para el caso de la secuencia 916delTT con elevada capacidad para discriminar el fenotipo mutante del salvaje y alcanzando un límite de detección 100 nM. Se han estudiado además, los efectos del uso de un espaciador lateral sobre esta monocapa, encontrándose que el uso de MCH disminuye su eficiencia para hibridar, por lo que se propone evitar su uso para la detección de estos productos.

ii) *con formato multi-analito:* Se ha puesto a punto la tecnología SPR para detectar secuencias de ADN tipo PCR en formato multianalito a partir de la formación de monocapas mixtas de ADN. Se han

realizado experimentos de optimización para formatos de dos secuencias con las monocapas 916delTT-185delAG por un lado y R1443X-5382insC, por otro. Para estas monocapas se han probado diferentes relaciones de concentración de cada secuencia para crear una monocapa con la máxima capacidad de respuesta. Los límites de detección encontrados para estas monocapas mixtas de dos analitos están por debajo de 50 nM. Este formato permitiría la detección de cuatro secuencias, inmovilizando dos secuencias en cada canal del biosensor SPR. Se ha analizado también la reproducibilidad y durabilidad de estas monocapas mixtas de ADN encontrándose que la reproducibilidad aumenta cuando la inmovilización se lleva a cabo de forma *ex-situ*, frente a la inmovilización en flujo; y que la durabilidad usando formamida al 35% como agente regenerador es elevada, pudiéndose usar estas monocapas durante al menos 40 ciclos sin constatar pérdida en la señal de hibridación. Asimismo, se ha extendido este formato a una monocapa mixta de cuatro secuencias demostrando una respuesta incluso superior en sensibilidad y poder de discriminación entre secuencia. Con este formato se podrían detectar hasta ocho secuencias inmovilizando cuatro secuencias por canal. Este tipo de formato nunca ha sido desarrollado con anterioridad y representa, tanto en límites de detección como en poder de discriminación entre fenotipos mutante y salvaje, un hito en la detección de ADN por biosensores ópticos y demuestra la alta capacidad de estos dispositivos para este fin.



LÍNEAS DE FUTURO

Las líneas de futuro que se abre este trabajo de Tesis están principalmente encaminadas a:

- *Demostrar la viabilidad de la aplicación a muestras reales* empleando productos de PCR extraídos de ADN proveniente de pacientes con cáncer de mama.
- *Mejorar la sensibilidad y capacidad de detección de los biosensores basados en SPR* empleando dispositivos como el Magnetoplasmon (MOSPR) o la técnica de Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR). Estas variantes del SPR convencional permiten alcanzar una mayor sensibilidad y concretamente el LSPR un mayor grado de multiplexado, lo que lo convierte en una excelente alternativa para aplicaciones genómicas.
- *Mejorar la sensibilidad y capacidad de detección de los biosensores nanomecánicos* mediante el desarrollo de nuevas plataformas biosensoras que permitan la detección múltiple usando sistemas matriciales. Para ello se han seleccionado dos estrategias:
 - i) Desarrollar un dispositivo nanomecánico matricial de 20 micropalanca con un sistema de lectura óptica mediante la alineación de una matriz de 20 láseres de emisión vertical (VSELs) y una matriz de 20 fotodetectores. Este dispositivo, denominado OPTONANOGEN posee además un sistema de flujo que permite la llegada de forma individualizada de las muestras a cada uno de las micropalanca, pudiéndose llevar a cabo la inmovilización selectiva de secuencias en cada micropalanca, por lo que resultaría idónea para las aplicaciones genómicas (Figura C1a). Por otra parte, las micropalanca de estos dispositivos son de fabricación propia y presentan propiedades mecánicas optimizadas que mejoran su sensibilidad y capacidad de respuesta.
 - ii) Desarrollo de un sistema matricial de micropalanca que elimine la necesidad de los alineamientos ópticos empleando micropalanca que sean al mismo tiempo guías de onda. Este sistema permitiría el multiplexado de las medidas evitando los

mayores problemas que supone el alineamiento óptico hoy en día para los biosensores nanomecánicos (Figura C1b).

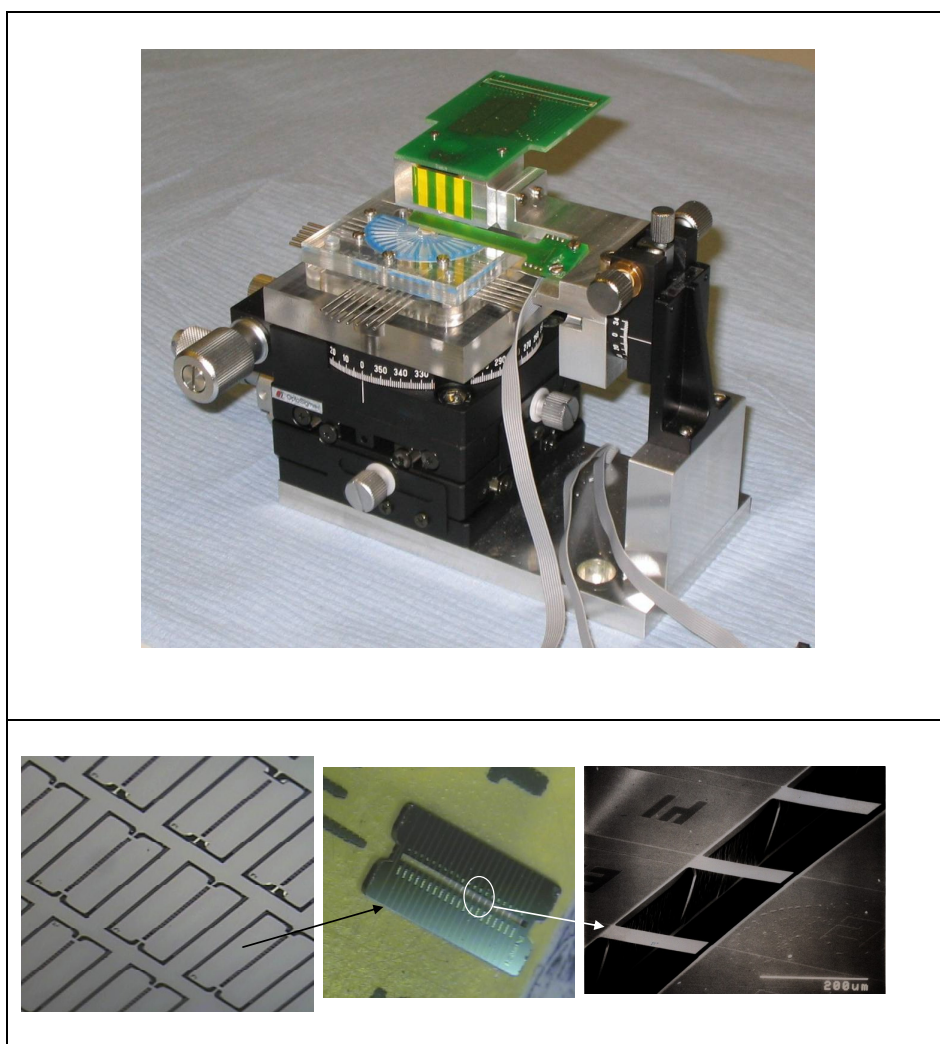


Figura C1. a) Fotografía de dispositivo multibiosensor OPTONANOGEN. b) Fotografía de las micropalancas ópticas.

Ambas estrategias se encuentran en este momento en desarrollo y las imágenes de los dispositivos se muestran en la Figura C1. Sin embargo, los experimentos de detección de ADN todavía no han sido realizados.

- *Extender los logros obtenidos con el biosensor SPR a otros dispositivos que presenten una mayor sensibilidad y capacidad de multiplexado.* Los primeros experimentos en este sentido se han realizado con el dispositivo

biosensor óptico interferométrico Mach Zehnder para la secuencia 916delTT. Para esta secuencia se ha conseguido llevar a cabo la identificación del fenotipo mutante y el salvaje con un límite de detección 10 pM, y un buen grado de discriminación. En la Figura C2 se muestra una imagen de este dispositivo y una curva de calibrado para esta secuencia para los fenotipos mutante, salvaje y una secuencia no complementaria.

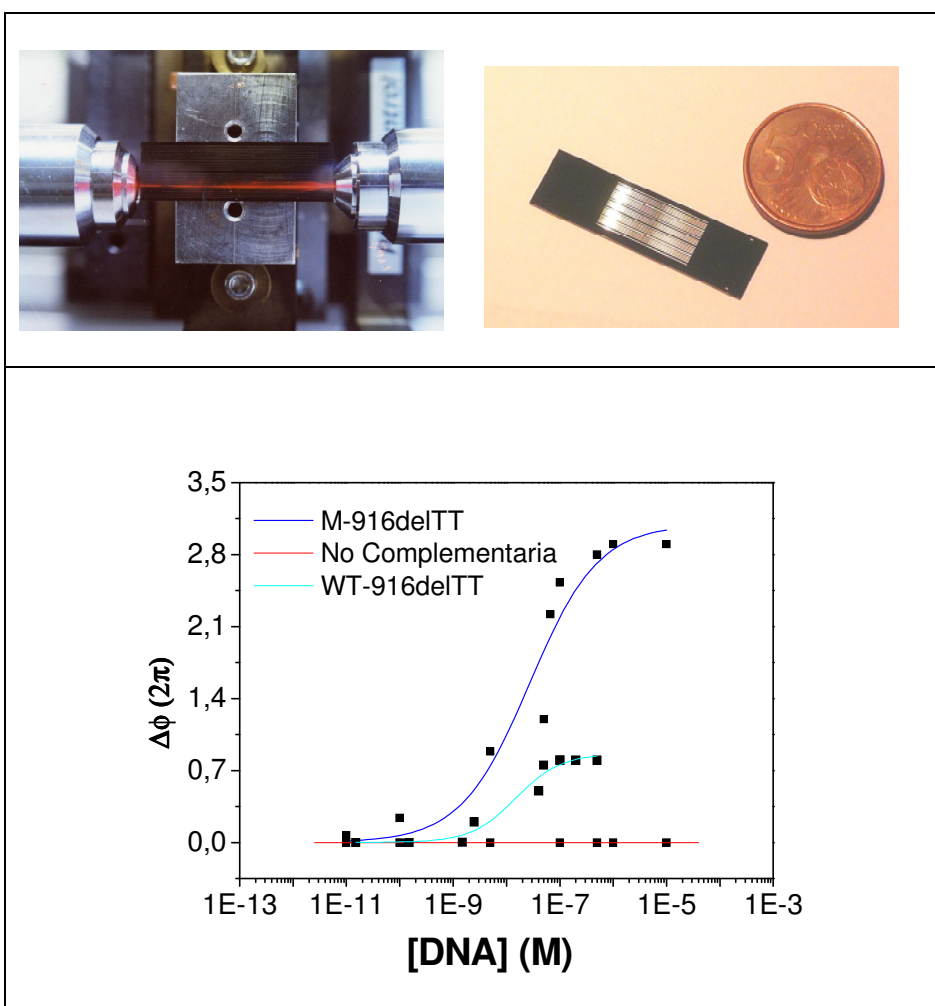


Figura C2. Imágenes de un dispositivo interferométrico Mach Zehnder (arriba) y de una curva de calibrado de la señal interferométrica con la concentración para los fenotipos mutante (M) y salvaje (WT) de la secuencia 916delTT.



BIBLIOGRAFÍA

1. Clark, L.C., *Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1962. **102**: p. 29-&.
2. Kadish, A.H. and D.A. Hall, *A New Method for Continuous Monitoring of Blood Glucose by Measurement of Dissolved Oxygen*. Clinical Chemistry, 1965. **11**(9): p. 869-&.
3. Updike, S.J. and G.P. Hicks, *Reagentless Substrate Analysis with Immobilized Enzymes*. Science, 1967. **158**(3798): p. 270-&.
4. Updike, S.J. and G.P. Hicks, *Enzyme Electrode*. Nature, 1967. **214**(5092): p. 986-&.
5. Clark, L.C., U.S. Patent Office, 1970. **3**: p. 539-455.
6. Lowe, C.R., *Biosensors*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci., 1989. **324**(1224): p. 487-96.
7. Cooper, M.A., *Label-free screening of bio-molecular interactions*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2003. **377**(5): p. 834-842.
8. Baird, C. and D. Myszka, *Current and emerging commercial optical biosensors*. Journal of Molecular Recognition, 2001. **14**(5): p. 261-268.
9. Lechuga, L.M., *Optical Biosensors*. Biosensors and Modern Biospecific Analytical Techniques. Comprehensive Analytical Chemistry Series Elsevier Science BV. Amsterdam (The Netherlands). , 2005.
10. Thévonot, D.R., et al., *Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification*. . Pure and Applied Chemistry. 1999. **71**: p. 2333-2348.
11. Matthews, D.R., et al., *Pen-sized digital 30 second blood glucose meter*. Lancet 1987. **2**: p. 778-9.
12. Morgan, C.L., D.J. Newman, and C.P. Price, *Immunosensors: Technology and opportunities in laboratory medicine*. Clinical Chemistry, 1996. **42**: p. 193-209.
13. Gokulrangan, G., et al., *DNA aptamer-based bioanalysis of IgE by fluorescence anisotropy*. Anal. Chem., 2005. **77**(7): p. 1963-1970.
14. Potyrailo, R., et al., *Adapting selected nucleic acid ligands (aptamers) to biosensors*. Anal. Chem., 1998. **70**(16): p. 419-3425.
15. Savran, C., et al., *Micromechanical detection of proteins using aptamer-based receptor molecules*. Analytical chemistry, 2004. **76**(11): p. 3194-3198.
16. Burgstaller, P., A. Jenne, and M. Blind, *Aptamers and aptazymes: accelerating small molecule drug discovery*. . Current Opinion in Drug Discovery and Development 2002. **5**: p. 690-700.
17. Niemeyer, C.M., *The developments of semisynthetic DNA-protein conjugates*. Trends in Biotechnology, 2002. **20**: p. 395-401.

18. Niemeyer, C.M., *Semi-synthetic DNA-protein conjugates: novel tools in analytics and nanobiotechnology*. Biochemical Society Transactions, 2004. **32**: p. 51-53.
19. Rechnitz, G.A. and M.Y. Ho, *Biosensors based on cell and tissue material*. Journal of Biotechnology, 1990. **15**: p. 201-217.
20. Candido, E.P. and D. Jones, *Transgenic Caenorhabditis elegans strains as biosensors*. Trends in Biotechnology, 1996. **14**: p. 125-129.
21. Li, B.X., Z.J. Zhang, and Y. Jin, *Plant tissue-based chemiluminescence flow biosensor for determination of unbound dopamine in rabbit blood with on-line microdialysis sampling*. Biosensors & Bioelectronics, 2002. **17**: p. 585-589.
22. Polak, M.E., D.M. Rawson, and B.G.D. Haggett, *Redox mediated biosensors incorporating cultured fish cells for toxicity assessment*. Biosensors & Bioelectronics, 1996. **11**: p. 1253-1257.
23. Karube, I., et al., *Microbiosensor Based on Silicon Fabrication Technology*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1987. **501**: p. 256-264.
24. Gizeli, E. and C.R. Lowe, *Immunosensors*. Biosensors and Bioelectronics, 1996. **11**(9): p. vii-vii.
25. Yano, K. and I. Karube, *Molecularly imprinted polymers for biosensor applications*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 1999. **18**(3): p. 199-204.
26. Sellergren, B., *Molecularly Imprinted Polymers-Man-Made Mimics of Antibodies and Their Application in Analytical Chemistry*. Elsevier, Amsterdam, 2001.
27. Mahony, J.O., et al., *Molecularly imprinted polymers--potential and challenges in analytical chemistry*. Analytica Chimica Acta. , 2005. **534**(1): p. 31-39.
28. Jiang, T., et al., *Detection of TP53 mutation using a portable surface plasmon resonance DNA-based biosensor*. Biosensors and Bioelectronics, 2005. **20**(10): p. 1939.
29. Bassil, N., et al., *One hundred spots parallel monitoring of DNA interactions by SPR imaging of polymer-functionalized surfaces applied to the detection of cystic fibrosis mutations*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2003. **94**(3): p. 313.
30. Gambari, R. and G. Feriotto, *Surface plasmon resonance for detection of genetically modified organisms in the food supply*. Journal of Aoac International, 2006. **89**(3): p. 893-897.
31. Vaisocherova, H., et al., *Investigating oligonucleotide hybridization at subnanomolar level by surface plasmon resonance biosensor method*. Biopolymers, 2006. **82**(4): p. 394-398.
32. Wang, J., *From DNA biosensors to gene chips*. . Nucleic Acids Research, 2000. **28**: p. 3011-3016.
33. Pilarik, M., H. Vaisocherova, and J. Homola, *A new surface plasmon resonance sensor for high-throughput screening applications*. Biosensors & Bioelectronics, 2005. **20**(10): p. 2104-2110.
34. Feriotto, G., et al., *Biosensor technology for real-time detection of the cystic fibrosis W1282X mutation in CFTR*. Human Mutation, 2001. **18**(1): p. 70-81.
35. Mckendry, R., et al., *Multiple label-free biodetection and quantitative DNA-binding on a nanomechanical cantilever array*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(15): p. 9783-9788.
36. Ferguson, J.A., et al., *A fiber-optic DNA biosensor microarray for the analysis of gene expression*. Nature Biotechnology, 1996. **14**: p. 1681-1684.

37. Luzzi, E., et al., *New trends in affinity sensing: aptamers for ligand binding*. Trends in Analytical Chemistry, 2003. **22**(11): p. 810-818.
38. Tombelli, S., M. Minunni, and M. Mascini, *Analytical applications of aptamers*. Biosensors and Bioelectronics, 2005. **20**: p. 2424-2434.
39. Rich, R.L. and D.G. Myszka, *Survey of the year 2006 commercial optical biosensor literature*. J Mol Recognit, 2007. **20**(5): p. 300-366.
40. Grundler, P., *Chemical sensors: An introduction for scientists & engineers*. In Chemical Sensors. Ed. Springer Berlin Heidelberg, 2007.
41. Turner, A.P.F., *Applications of direct electron transfer bioelectrochemistry in sensors and cells*. Biotech 83. Online Publications, Northwood, U.K. , 1983.
42. Cass, A.E.G., et al., *Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose*. Anal. Chem., 1984. **56**: p. 667.
43. Koncki, R., *Recent developments in potentiometric biosensors for biomedical analysis*. Anal Chim Acta, 2007. **599**(1): p. 7-15.
44. Powley, C.R., R.F. Geiger, and R.A. Nieman, *Bipolar pulse conductance measurements with a calcium ion-selective electrode*. Anal. Chem., 1980. **52**: p. 705-709.
45. Carrascosa, L.G., et al., *Nanomechanical biosensors: a new sensing tool*. Trends in Analytical Chemistry (TRAC), 2006. **25**: p. 196-206.
46. Datskos, P.G., T. Thundat, and N.V. Lavrik, *Micro and Nanocantilever Sensors*. Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, 2004. **X**: p. 1-10.
47. Fritz, J., et al., *Translating biomolecular interactions into nanomechanics*. Science, 2000. **88**(5464): p. 316-318.
48. Rich, R.L. and D.G. Myszka, *Why you should be using more SPR biosensor technology*. Drug Discovery Today: Technologies, 2004. **1**(3): p. 301-308.
49. Tamir, T., *Guided-wave optoelectronics*. Springer, Berlin, 1988.
50. Wolfbeis, O.S., *Fibre Optic Chemical Sensors and Biosensors*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1991. **I y II**.
51. Arnold, M.A., *Fibre-Optic Biosensors*. J. Biotechnol., 1990. **36**: p. 39
52. Campbell, D.P. and J. McCloskey, *Interferometric Biosensor*. In: Optical Biosensors: present and future. Ed. F. Liegler and C.Rowe, Elsevier, Amsterdam (NL), 2002: p. 277-304.
53. Lechuga, L.M., F. Prieto, and B. Sepúlveda, *Interferometric Biosensors for environmental pollution detection*. In: Optical Sensors for Industrial, Ed. Springer (Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors). , 2003.
54. Prieto, F., et al., *An integrated optical interferometric nanodevice based on silicon technology for biosensor applications*. Nanotechnology, 2003. **14**: p. 907.
55. Homola, J., S.S. Yee, and G. Gauglitz, *Surface plasmon resonance sensors: review*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1999. **54**(1-2): p. 3-15.
56. Homola, J., *Present and future of surface plasmon resonance biosensors*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2003. **377**: p. 528-539.
57. Homola, J., *Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species*. Chem. Rev., 2008. **108**(2): p. 462 - 493.
58. Rich, R.L. and D.G. Myszka, *Survey of the 1999 surface plasmon resonance biosensor literature*. Journal of Molecular Recognition, 2000. **13**(6): p. 388-407.
59. Myszka, D.G., *Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors*. Current Opinion in Biotechnology, 1997. **8**: p. 50-57.

60. Myszka, D., *Quantitating the time component of protein interactions*. *Faseb Journal*, 2004. **18**: p. C113-C113.
61. Kretschmann, E. and H. Raether, *Plasma Resonance Emission in Solids*. *Zeitschrift Fur Naturforschung Part a-Astrophysik Physik Und Physikalische Chemie*, 1968. **A 23**: p. 615-&.
62. Liedberg, B., C. Nylander, and I. Lundstrom, *Surface-Plasmon Resonance for Gas-Detection and Biosensing*. *Sensors and Actuators B*, 1983. **4**: p. 299-304.
63. Raether, H., *Surface plasmons oscillations and their applications*. *Physics of Thin Films*, 1977. **9**(Academic Press): p. 145-262.
64. Raether, H., *Surface-Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings*. *Springer Tracts in Modern Physics*, 1988. **111**: p. 1-133.
65. Homola, J., I. Koudela, and S.S. Yee, *Surface plasmon resonance sensors based on diffraction gratings and prism couplers: sensitivity comparison*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 1999. **54**: p. 16-24.
66. Hutley, M.C., *Diffraction gratings*. Academic Press. London, 1982.
67. Rich, R.L. and D.G. Myszka, *BLACORE J: a new platform for routine biomolecular interaction analysis*. *Journal of Molecular Recognition*, 2001. **14**: p. 223-228.
68. Davis, T.M. and W.D. Wilson, *Determination of the refractive index increments of small molecules for correction of surface plasmon resonance data*. *Analytical Biochemistry*, 2000. **284**: p. 348-353.
69. Myszka, D.G., M.D. Jonsen, and B.J. Graves, *Equilibrium analysis of high affinity interactions using BLACORE*. *Analytical Biochemistry*, 1998. **265**: p. 326-330.
70. Binnig, G., C.F. Quate, and C. Gerber, *Atomic Force Microscope*. *Physical Review Letters*, 1986. **56**(9): p. 930-933.
71. Lee, G.U., D.A. Kidwell, and R.J. Colton, *Sensing Discrete Streptavidin Biotin Interactions with Atomic-Force Microscopy*. *Langmuir*, 1994. **10**(2): p. 354-357.
72. Lee, G.U., L.A. Chrisey, and R.J. Colton, *Direct Measurement of the Forces between Complementary Strands of DNA*. *Science*, 1994. **262**66(5186): p. 771-773.
73. Dammer, U., et al., *Specific antigen/antibody interactions measured by force microscopy*. *Biophysical Journal*, 1996. **70**(5): p. 2437-2441.
74. Lavrik, N., M. Sepaniak, and P. Datskos, *Cantilever transducers as a platform for chemical and biological sensors*. *Review of scientific instruments*, 2004. **75**(7): p. 2229-2253.
75. Yu, X., et al., *Optimization of sensitivity and noise in piezoresistive cantilevers*. *J Appl Phys*, 2002. **92**(10): p. 6296-6301.
76. Hansen, K.M., et al., *Cantilever-based optical deflection assay for discrimination of DNA single-nucleotide mismatches*. *Analytical Chemistry*, 2001. **73**(7): p. 1567-1571.
77. Wu, G., et al., *Bioassay of prostate-specific antigen (PSA) using microcantilevers*. *Nature Biotechnology*, 2001. **19**: p. 856-860.
78. Arntz, Y., et al., *Label-free protein assay based on a nanomechanical cantilever array*. *Nanotechnology*, 2003. **14**(1): p. 86-90.
79. Alvarez, M., et al., *Development of nanomechanical biosensors for detection of the pesticide DDT*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2003. **18**: p. 649-653.

80. Khaled, A.-R.A., et al., *Analysis, control and augmentation of microcantilever deflections in bio-sensing systems*. Sensor and Actuators B, 2003.
81. Wu, G., *Origin of nanomechanical cantilever motion generated from biomolecular interactions*. PNAS, 2001. **98**(4): p. 1560-64.
82. Alvarez, M., et al., *Nanomechanics on the formation of DNA self-assembled monolayers and hybridisation on microcantilevers*. Langmuir, 2004. **20**(22): p. 9663-9676.
83. Stoney, G.G., *The tension of metallic films deposited by electrolysis*. Proceedings of the Royal Society of London A, 1909. **A82**: p. 172.
84. Suman and A. Kumar, *Recent Advances in DNA Biosensor*. Sensors & Transducers Journal, 2008. **92**(5): p. 122-133.
85. Piunno, P.A.E., et al., *Fiber-Optic DNA Sensor for Fluorimetric Nucleic Acid Determination*. Analytical Chemistry, 1995. **67**: p. 2635-2643.
86. Dubertret, B., M. Calame, and A.J. Libchaber, *Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides*. Nature Biotechnology, 2001. **19**: p. 365-70.
87. Antony, T. and V. Subramaniam, *Molecular beacons: nucleic acid hybridization and emerging applications*. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2001. **19**: p. 497-504.
88. Feriotto, G., et al., *Real-time multiplex analysis of four beta-thalassemia mutations employing surface plasmon resonance and biosensor technology*. Laboratory Investigation, 2004. **84**(6): p. 796-803.
89. Feriotto, G., et al., *Quantitation of Bt-176 maize genomic sequences by surface plasmon resonance-based biospecific interaction analysis of multiplex polymerase chain reaction (PCR)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(16): p. 4640-4646.
90. Breveglieri, G., et al., *Recent advances in molecular diagnosis using surface plasmon resonance and biosensor technology for detection of beta-thalassemia mutations*. Minerva Biotechnologica, 2003. **15**(2): p. 93-97.
91. Feriotto, G., et al., *Peptide nucleic acids and biosensor technology for real-time detection of the cystic fibrosis W1282X mutation by surface plasmon resonance*. Laboratory Investigation, 2001. **81**(10): p. 1415-1427.
92. Nilsson, P., et al., *Detection of mutations in PCR products from clinical samples by surface plasmon resonance*. Journal of Molecular Recognition, 1997. **10**(1): p. 7-17.
93. Sato, Y., et al., *Flow-stress-induced discrimination of a K-ras point mutation by sandwiched polymer microsphere-enhanced surface plasmon resonance*. Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition, 2004. **15**(3): p. 297-310.
94. Kawaguchi, H., et al., *Enhancement of sensitivity and selectivity in surface plasmon resonance detection of a DNA point mutation by polymeric microspheres*. E-Polymers, 2005: p. -.
95. Yao, X., et al., *Sub-attomole oligonucleotide and p53 cDNA determinations via a high-resolution surface plasmon resonance combined with oligonucleotide-capped gold nanoparticle signal amplification*. Analytical Biochemistry, 2006. **In Press**, **Corrected Proof**.
96. Kim, D.-K., et al., *Label-Free DNA Biosensor Based on Localized Surface Plasmon Resonance Coupled with Interferometry*. Anal Chem. , 2007. **79**(5): p. 1855-64.

97. Zinoviev, K., et al., *Silicon Photonic Biosensors for Lab-on-a-Chip Applications*. Advances in Optical Technologies. In Press, 2008.
98. Zhang, C.-Y., et al., *Single quantum-dot-based DNA nanosensor*. Nature Materials, 2005. **4**: p. 826-830.
99. Chen, R.W., et al., *Real-time PCR for detection and quantification of hepatitis B virus DNA*. Journal of Medical Virology, 2001. **65**: p. 250-256.
100. Mikkelsen, S.R., *Electrochemical biosensors for DNA sequence detection*. Electroanalysis, 1996. **15-22**(8).
101. Wang, J., *Towards Genoelectronics: Electrochemical Biosensing of DNA Hybridization*. Chemistry- A European Journal, 1999. **5**(6): p. 1681-1685.
102. Millan, K.M., A. Saraulo, and S.R. Mikkelsen, *Voltammetric DNA biosensor for cystic fibrosis based on a modified carbon paste electrode*. Analytical Chemistry, 1994. **66**: p. 2943-2948.
103. Takenaka, S., et al., *Electrochemically Active Threading Intercalator with High Double Stranded DNA Selectivity*. Chemical Communications, 1998: p. 1111-1112.
104. Wang, J., et al., *Indicator-Free Electrochemical DNA Hybridization Biosensor*. Anal. Chim. Acta, 1998. **375**: p. 197.
105. Johnston, D.H., K.C. Glasgow, and H.H. Thorp, *Electrochemical Measurements of the Solvent Accessibility of Nucleobases Using Electron Transfer between DNA and Metal Complexes*. J. Am. Chem. Soc, 1995. **117**: p. 8933.
106. Korri-Youssoufi, H., et al., *Toward Bioelectronics: Specific DNA Recognition Based on an Oligonucleotide-Functionalized Polypyrrole*. Journal American Chem. Society 1997. **119**: p. 7388-7389.
107. Wang, J., et al., *New label-free DNA recognition based on doping nucleic-acid probes within conducting polymer films*. Analytica Chimica Acta, 1999. **402**(1/2): p. 7-12.
108. Holmlim, R.E., P.J. Dandliker, and J.K. Barton, *Charge Transfer through the DNA Base Stack*. Angnew Chem. Int. Ed. Engl, 1997. **36**: p. 2714-2730.
109. Merkoçi, A., et al., *New materials for electrochemical sensing V: Nanoparticles for DNA labeling*. TRAC - trends in analytical chemistry, 2005. **24**(4): p. 341-349.
110. Pingang, H., X. Ying, and F. Yuzhi, *Application of carbon nanotubes in electrochemical DNA biosensor*. Microchim Acta, 2006. **152**: p. 175-186.
111. Cai, H., et al., *Carbon nanotube-enhanced electrochemical DNA biosensor for DNA hybridization detection*. Anal Bioanal Chem, 2003. **375**: p. 287-293.
112. Dell'Atti, D., et al., *Detection of clinically relevant point mutations by a novel piezoelectric biosensor*. Biosensors and Bioelectronics, 2006. **21**: p. 1876-1879.
113. Tombelli, S., et al., *Coupling of a DNA piezoelectric biosensor and polymerase chain reaction to detect apolipoprotein- E polymorphisms*. Biosens. Bioelectron., 2000. **15**: p. 363-370.
114. Mannelli, I., et al., *Quartz crystal microbalance (QCM) affinity biosensor for genetically modified organisms (GMOs) detection*. Biosens. Bioelectron., 2003. **18**: p. 129-140.
115. Ye, M., S.V. Letcher, and A.G. Rand, *Piezoelectric biosensor for detection of Salmonella typhimurium*. J.Food Sci., 1997. **62**(5): p. 1067-76.

116. Towery, R.B., et al., *Genomic DNA hybridizes with the same rate constant on the QCM biosensor as in homogeneous solution*. Biosens. Bioelectron., 2001. **16**: p. 1-8.
117. Glynou, K., et al., *Oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles as probes in a dry-reagent strip biosensor for DNA analysis by hybridization*. Anal Chem., 2003. **75**: p. 4155-4160.
118. Wang, J., *DNA biosensors based on peptide nucleic acid (PNA) recognition layers*. Biosens Bioelectron, 1998. **13**: p. 757-762.
119. Wang, J., G. Rivas, and X. Cai, *Detection of point mutation in the p53 gene using peptide nucleic acid biosensor*. Anal Chim Acta, 1997b. **344**: p. 111-118.
120. Wang, J., et al., *Mismatch-sensitive hybridization detection by Peptide Nucleic Acids immobilized on a quartz crystal microbalance*. Anal Chem., 1997a. **69**: p. 5200-5202.
121. Weiler, J., et al., *Hybridization based DNA screening on peptide nucleic acid (PNA) oligomer arrays*. Nucleic Acids Research, 1997. **25**: p. 2792-2799.
122. Li, A., et al., *Electrochemical impedance detection of DNA hybridization based on dendrimer modified electrode*. Biosensors and Bioelectronics, 2007. **22**(8): p. 1716-1722.
123. Han, S., et al., *A three-dimensional heterogeneous DNA sensing surface formed by attaching oligodeoxynucleotide-capped gold nanoparticles onto a gold-coated quartz crystal*. Chem. Commun. , 2001: p. 609-610.
124. Eggins, B.R., *Chemical Sensors and Biosensors*. Ed. Wiley, 2002.
125. Schreiber, F., *Structure and growth of self-assembling monolayers*. Progress in Surface Science, 2000. **65**(5-8): p. 151-256.
126. Schwartz, D.K., *Mechanisms and kinetics of self-assembled monolayer formation*. Annual Review of Physical Chemistry, 2001. **52**: p. 107-137.
127. Nuzzo, R.G. and D.L. Allara, *Journal of the American Chemical Society*, 1983. **105**: p. 4481-4483.
128. Boon, E.M., et al., *Langmuir*, 2001. **17**: p. 5727.
129. Herne, M. and M.J. Tarlov, *Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces*. *Journal of the American Chemical Society*, 1997. **119**: p. 8916-8920.
130. Levicky, R., et al., *Using self-assembly to control the structure of DNA monolayers on gold: a neutron reflectivity study*. *Journal of the American Chemical Society*, 1998. **120**: p. 9787-9792.
131. Petrovykh, D.Y., et al., *Quantitative analysis and characterization of DNA immobilised on gold*. *Journal of the American Chemical Society*, 2003. **125**: p. 5219-5226.
132. Steel, A.B., et al., *Immobilization of Nucleic Acids at Solid Surfaces: Effect of Oligonucleotide Length on Layer Assembly*. *Biophysical Journal*, 2000. **79**(2): p. 975-981.
133. Tarlov, M.J. and A. Steel, *DNA-Based Sensors (Chapter 12)*. In *Biomolecular Films: Design, Function, and Applications*. Rusling, JF, Ed.; Marcel Dekker: New York, 2003. **111**: p. 545-608.
134. Gong, P., et al., *Hybridization behavior of mixed DNA/alkylthiol monolayers on gold: Characterization by surface plasmon resonance and P-32 radiometric assay*. *Analytical Chemistry*, 2006. **78**(10): p. 3326-3334.

135. Peeters, S., et al., *Impact of spacers on the hybridization efficiency of mixed self-assembled DNA/alkanethiol films*. Biosensors and Bioelectronics, 2008. **In press. Corrected proof.**
136. Peterson, A.W., L.K. Wolf, and R.M. Georgiadis, *Hybridization of mismatched or partially matched DNA at surfaces*. J. Am. Chem. Soc., 2002. **124**: p. 14601-14607.
137. Sakao, Y., et al., *Hybridization of oligonucleotide by using DNA self-assembled monolayer*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2005. **40**(3-4): p. 149.
138. Kupčiūnaitė, J., et al., *Study of ssDNA immobilization and hybridization on gold substrate with quartz crystal microbalance*. BIOLOGIJA, 2006. **3**: p. 1-3.
139. Yoshimoto, K., et al., *Immobilization and Hybridization Behavior of DNA on Poly(ethylene glycol)-block-Poly[2-(N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate]-modified Gold Surfaces*. Chemistry Letters, 2007. **36**(12): p. 1444.
140. Cantor, D., *The History of Cancer - an Annotated-Bibliography* - Olson, J.s. Annals of Science, 1993. **50**(1): p. 96-97.
141. Kleinsmith, L., *Principles of Cancer Biology*. Pearson Benjamin Cummings., 2006.
142. Knowles, M.A., *Introduction to the cellular and molecular biology of cancer*. 4th ed. New York : Oxford University Press, 2005.
143. McKinnell, R.G., et al., *THE BIOLOGICAL BASIS OF CANCER* (eds.) Cambridge University Press, UK, 1998.
144. Hornberg, J., et al., *Cancer: a Systems Biology disease*. Biosystems, 2006 **83**(2-3): p. 81-90.
145. American Cancer Society, *Marcadores tumorales*. http://www.cancer.org/docroot/ESP/content/ESP_2_1x_Marcadores_tumorales.asp, 2006.
146. American Cancer Society, A., <http://www.cancer.org/docroot/home/index.asp>.
147. Claus, E., et al., *The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer*. Cancer, 1996. **77**: p. 2318-24.
148. Newman, B., et al., *Frequency of breast cancer attributable to BRCA1 in a population-based series of American women*. JAMA, 1998. **279** p. 915-21.
149. Hodgson, S.V. and E.R. Maher, *A Practical Guide to Human Cancer Genetics* Cambridge University Press, Cambridge Second edition 1999.
150. Emery, J., A. Lucassen, and M. Murphy, *Common hereditary cancers and implications for primary care*. Lancet, 2001. **358**(9275): p. 56-63.
151. Vineis, P., P. Schulte, and A. McMichael, *Misconceptions about the use of genetic tests in populations*. . Lancet Oncology, 2001. **357**: p. 709-12.
152. Bishop, J., *The molecular genetics of cancer*. Science, 1987. **235**: p. 305-311.
153. Bishop, J., *Molecular theories in oncogenesis*. Cell, 1991. **64**: p. 235-248.
154. Margolin, S., et al., *Family history, and impact on clinical presentation and prognosis, in a population-based breast cancer cohort from the Stockholm County*. Fam Cancer, 2006. **5**: p. 309-21.
155. Lynch, H., et al., *Genetic and pathologic findings in a kindred with hereditary sarcoma, breast cancer, brain tumors, leukemia, lung, laryngeal, and adrenal cortical carcinoma*. . Cancer, 1978. **41**: p. 2055-64.

156. Breast Cancer Linkage Consortium, *Pathology of familial breast cancer: difference between breast cancers in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations and sporadic cases.* . Lancet, 1997. **349**(9064): p. 1505-1510.
157. The European Molecular Genetics Quality Network, www.emqn.org, 1997.
158. Miki, Y., et al., *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1.* Science., 1994. **266**: p. 66-71.
159. Ford, D. and D. Easton, *The genetics of breast and ovarian cancer.* Br J Cancer, 1995. **72**: p. 805-12.
160. Wooster, R., et al., *Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2.* Nature, 1995. **378**: p. 789-92.
161. Ford, D., et al., *Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in Breast cancer families.* Am J Human Genetics, 1998. **62**(3): p. 676-689.
162. Wooster, R. and B. Weber, *Breast and ovarian cancer.* New English Journal of Medicine, 2003(348): p. 2339-2347.
163. Hodgson, S.V., P.J. Morrison, and M. Irving, *Breast cancer genetics: Unsolved questions and open perspectives in an expanding clinical practice.* American Journal of Medical Genetics Part C-Seminars in Medical Genetics, 2004. **129C**(1): p. 56-64.
164. Hall, J.M., et al., *Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21.* Science, 1990. **250**: p. 1684-9.
165. Wooster, R., et al., *Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13.* Science, 1994. **265**: p. 2088-90.
166. Tavtigian, S.V., et al., *The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds.* Nat Genet, 1996. **12**: p. 333-7.
167. American College of Medical Genetics, *Genetic susceptibility to breast and ovarian cancer: assessment, counselling and testing guidelines.* <http://www.acmg.net>, 1999.
168. Friedman, L., et al., *Novel inherited mutations and variable expressivity of BRCA1 alleles, including the founder mutation 185delAG in Ashkenazi Jewish families.* . Am J Hum Genet, 1995. **57**: p. 1284-1297.
169. Ferla, R., et al., *Founder mutations in BRCA1 and BRCA2 genes.* Annals of Oncology, 2007. **18**(6): p. vi93-vi98.
170. Peelen, T., et al., *A high proportion of novel mutations in BRCA1 with strong founder effects among Dutch and Belgian hereditary breast and ovarian cancer families.* Am J Hum Genet, 1997. **60**: p. 1041-9.
171. Thorlacius, S., et al., *Study of a single BRCA2 mutation with high carrier frequency in a small population.* . Am J Hum Genet, 1997. **60**: p. 1079-84.
172. Borg, A., et al., *BRCA1 1675delA and 1135insA account for one third of Norwegian familial breast-ovarian cancer and are associated with later disease onset than less frequent mutations.* . Dis Markers, 1999. **15**: p. 79-84.
173. Vega, A., et al., *The R71G BRCA1 is a founder Spanish mutation and leads to aberrant splicing of the transcript.* . Hum Mutat, 2002. **17**: p. 520-1.
174. Llort, G., et al., *Low frequency of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Spain.* Hum Mutat, 2002. **19**: p. 307.

175. Diez, O., et al., *Analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Spanish breast/ovarian cancer patients: a high proportion of mutations unique to Spain and evidence of founder effects.* . Hum Mutat, 2003. **22**: p. 301-12.
176. Struwing, J.P., et al., *The carrier frequency of the BRCA1 185delAG mutation is approximately 1 percent in Ashkenazi Jewish individuals.* . Nat Genet, 1995. **11**: p. 198-200.
177. Oddoux, C., et al., *The carrier frequency of the BRCA2 6174delT mutation among Ashkenazi Jewish individuals is approximately 1%.* . Nat Genet, 1996. **14**: p. 188-90.
178. Roa, B.B., et al., *Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2.* . Nat Genet 1996. **14**: p. 185-7.
179. Neuhausen, S., et al., *Recurrent BRCA2 6174delT mutations in Ashkenazi Jewish women affected by breast cancer.* Nat Genet 1996. **13**: p. 126-128.
180. Smith, T.M., et al., *Complete genomic sequence and analysis of 117kb of human DNA containing the gene BRCA1.* Genome Res., 1996. **6**: p. 1029-1049.
181. Xu, C.-F., J.A. Chambers, and E. Solomon, *Complex Regulation of the BRCA1 Gene.* American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 1997. **272**(34): p. 20994-20997.
182. Saurin, A., et al., *Does this have a familiar RING?* Trends Biochem Sci., 1996. **21**(6): p. 208-14.
183. Wu, L., et al., *Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product.* Nat Genet. , 1996. **14**(4): p. 430-40.
184. Jensen, D.E., et al., *BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression.* Oncogene, 1998. **16**: p. 1097-1112.
185. Koonin, E., S. Altschul, and P. Bork, *BRCA1 protein products ... Functional motifs.* Nat Genet, 1996. **13**(3): p. 266-8.
186. Bork, P., et al., *A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins.* FASEB J., 1997. **11**(1): p. 68-76.
187. Callebaut, I. and J.P. Mornon, *From BRCA1 to RAP 1, a widespread BRCT module closely associated with DNA repair.* Febs Letters, 1997. **400**: p. 25-30.
188. Wang, H., et al., *BRCA1 proteins are transported to the nucleus in the absence of serum and splice variants BRCA1a, BRCA1b are tyrosine phosphoproteins that associate with E2F, cyclins and cyclin dependent kinases.* Oncogene, 1997. **15**: p. 143-157.
189. Rajan, J., et al., *Developmental expression of BRCA2 colocalizes with BRCA1 and is associated with proliferation and differentiation in multiple tissues.* Dev Biol, 1997. **184**: p. 385-401.
190. Spillman, M. and A. Bowcock, *BRCA1 and BRCA2 mRNA levels are coordinately elevated in human breast cancer cells in response to estrogen.* Oncogene, 1996. **13**(8): p. 1639-1645.
191. Stratton, M.R., et al., *Familial male breast cancer is not linked to the BRCA1 locus on chromosome 17q.* Nat Genet, 1994. **7**: p. 103-7.
192. Welch, P., E. Schubert, and M. King, *Inherited breast cancer: an emerging picture.* Clin Genet, 1998. **54**: p. 447-58.
193. Scully, R. and D. Livingston, *In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2.* Nature, 2000. **408**: p. 429-32.

194. Petrij-Bosch, A., et al., *BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients*. Nat Genet, 1997. **17**: p. 341-345.
195. Swensen, J., et al., *Identification of a 14 kb deletion involving the promoter region of BRCA1 in a breast cancer family*. Hum Mol Genet., 1997. **6**: p. 1513-7.
196. Brown, M.A., et al., *Germline BRCA1 promoter deletions in UK and Australian familial breast cancer patients: Identification of a novel deletion consistent with BRCA1:psiBRCA1 recombination*. Hum Mutat, 2002. **19**: p. 435-42.
197. Futreal, P.A., et al., *BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas*. Science, 1994. **266**: p. 120-2.
198. Lancaster, J.M., et al., *BRCA2 mutations in primary breast and ovarian cancers*. Nat Genet, 1996. **13**: p. 238-40.
199. Teng, D.H., et al., *Low incidence of BRCA2 mutations in breast carcinoma and other cancers*. Nat Genet, 1996. **13**: p. 241-4.
200. Kwiatkowska, E., et al., *Somatic mutations in the BRCA2 gene and high frequency of allelic loss of BRCA2 in sporadic male breast cancer*. Int J Cancer, 2002. **98**: p. 943-5.
201. Chan, K.Y., et al., *Epigenetic factors controlling the BRCA1 and BRCA2 genes in sporadic ovarian cancer*. . Cancer Res, 2002. **62**: p. 4151-6.
202. Yang, Q., et al., *BRCA1 in non-inherited breast carcinomas (Review)*. Oncol Rep, 2002. **9**: p. 1329-33.
203. Catteau, A., et al., *Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics*. Oncogene, 1999. **18**: p. 1957-65.
204. Baldwin, R.L., et al., *BRCA1 promoter region hypermethylation in ovarian carcinoma: a population-based study*. Cancer Res, 2000. **60**: p. 5329-33.
205. Rice, J.C., et al., *Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens*. . Carcinogenesis, 2001. **21**: p. 1761-5.
206. www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=BRCA1.
207. Ahlquist, D.A., *Molecular stool screening for colorectal cancer - Using DNA markers may be beneficial, but large scale evaluation is needed*. British Medical Journal, 2000. **321**(7256): p. 254-255.
208. Ahlquist, D.A., et al., *Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: Feasibility of a multitarget assay panel*. Gastroenterology, 2000. **119**(5): p. 1219-1227.
209. Sidransky, D., et al., *Identification of Ras Oncogene Mutations in the Stool of Patients with Curable Colorectal Tumors*. Science, 1992. **256**(5053): p. 102-105.
210. Sidransky, D., et al., *Inherited p53 gene mutations in breast cancer*. Cancer Res, 1992. **52**: p. 2984-6.
211. Sidransky, D., et al., *Identification of P53 Gene-Mutations in Bladder Cancers and Urine Samples*. Science, 1991. **252**(5006): p. 706-709.
212. Goessl, C., *Diagnostic potential of circulating nucleic acids for oncology*. Expert Review of Molecular Diagnostics, 2003. **3**(4): p. 431-442.
213. Lo, Y. and R. Chiu, *The biology and diagnostic applications of plasma RNA*. Circulating nucleic acids in plasma/serum III and serum proteomics (Annals of the New York Academy of Sciences), 2004. **1022**: p. 135-139.

214. Mulcahy, H., et al., *A prospective study of K-ras mutations in the plasma of pancreatic cancer patients*. Clinical Cancer Research, 1998. **4**: p. 271-275.
215. Holdenrieder, S. and P. Stieber, *Apoptotic markers in cancer*. Clinical Biochemistry, 2004. **37**(7): p. 605-617.
216. Esteller, M., *Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes*. European Journal of Cancer, 2000. **36**(18): p. 2294-2300.
217. Issa, J.P., *The epigenetics of colorectal cancer*. Colorectal Cancer: New Aspects of Molecular Biology and Immunology and Their Clinical Applications, 2000. **910**: p. 140-155.
218. Ensenauer, R.E., V.V. Michels, and S.S. Reinke, *Genetic testing: Practical, ethical, and counseling considerations*. Mayo Clinic Proceedings, 2005. **80**(1): p. 63-73.
219. Nollau, P. and C. Wagener, *Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment*. Clinical Chemistry 1997. **43** (7): p. 1114-1128
220. Roest, P.A.M., et al., *General Applicable Protein Truncation Test (Ptt) to Detect Translation Terminating Mutations*. American Journal of Human Genetics, 1993. **53**(3): p. 216-216.
221. Hogervorst, F.B.L., et al., *Rapid Detection of Brca1 Mutations by the Protein Truncation Test*. Nature Genetics, 1995. **10**(2): p. 208-212.
222. Hogervorst, F.B.L., *The Protein Truncation Test (PTT)* Promega Notes Magazine, 1997. **62**: p. 07-12.
223. Hayashi, K., *A method for the detection of mutations*. Genetic Analysis, Techniques and Applications, 1992. **9**: p. 73-79.
224. Delwart, E.L., et al., *Genetic relationships determined by a heteroduplex mobility assay: analysis of HIV env genes*. Science, 1993. **262**: p. 1257-1261.
225. Myers, R.M., et al., *Detection of single base substitutions in total genomic DNA*. Nature, 1985. **313**: p. 495-498.
226. Lipshutz, R., et al., *Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity*. Biotechniques, 1995. **19**: p. 442-7.
227. Southern, E., *DNA chips: analysing sequence by hybridization to oligonucleotides on a large scale*. Trends Genet 1996. **12**: p. 110-5.
228. Taylor, G., *A mutation detective's handbook: Mutation Detection: A Practical Approach*. Ed by R.G.H. Cotton, E. Edkins and S. Forrest, Trends in Genetics, 1999. **15**(1): p. 39-40.
229. Sokolov, B., *Primer extension technique for the detection of single nucleotide in genomic DNA*. Nucleic Acids Research, 1989. **18**: p. 3671.
230. Landegren, U., et al., *A ligase-mediated gene detection technique*. Science, 1988. **241**: p. 1077-80.
231. Myriad Genetic Laboratories, *BRACAnalysis® Technical Specifications*. http://www.myriadtests.com/provider/doc/tech_specs_brac.pdf, updated 2005.
232. Institut Curie, Assistance publique hôpitaux de Paris, and Institute Gustave-Roussy, *Another victory for opponents of patents held by Myriad Genetics: European Patent Office rejects the essential points of BRCA1 gene patents*. Press release. <http://www.curie.fr/upload/presse/myriadpatents310105.pdf>, 2005.

233. The BRCA1 Exon 13 Duplication Screening Group, *The Exon 13 duplication in the BRCA1 gene is a founder mutation present in geographically diverse population*. American Journal of Human Genetics, 2000. **67**: p. 207-212.
234. Rohlf, E.M., et al., *An Alu-mediated 7.1 kb deletion of BRCA1 exons 8 and 9 in breast and ovarian cancer families that results in alternative splicing of exon 10*. Genes Chr & Cancer, 2000. **28**: p. 300-307.
235. Ghosh, P.K., *Introduction to Photoelectron Spectroscopy*. Chemical Analysis. Wiley Interscience, 1983. **67**.
236. Schlenoff, J.B., M. Li, and H. Ly, J. Am. Chem. Soc., 1995. **117**: p. 12528-12536.
237. Bain, C.D., H.A. Biebuyck, and G.M. Whitesides, *Comparison of self-assembled monolayers on gold: Coadsorption of thiols and disulfides*. Langmuir, 1989. **5**: p. 723-727.
238. Huang, H.-M., et al., Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry, 2005. **43** p. 4710-4720.
239. Cavalleri, O., Oliveri, L., Dacca, A., Parodi, R. and Rolandi, R., *XPS measurements on L-cysteine and 1-octadecanethiol self-assembled films: a comparative study*. Appl. Surf. Sci., 2001. **175-176**: p. 357-362.
240. Cavalleri, O., Gonella, G., Terreni, S., Vignolo, M., Pelori, P., Floreano, L., Morgante, A., Canepa M. and Rolandi, R., *High resolution XPS of the S 2p core level region of the L-cysteine/gold interface* J. Phys.: Condens. Matter, 2004. **16**: p. S2477-S2482.
241. Wirde, M., Gelius, U., Dunbar, T. and Allara, D.L. *Modification of self-assembled monolayers of alkanethiols on gold by ionizing radiation* Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res. B, 1997. **131** p. 245-251.
242. Zerulla, D., Uhlig, I., Szargan, R. and Chassé T. *Competing interaction of different thiol species on gold surfaces* Sur. Sci., 1998. **402-404**: p. 604-608.
243. Willey, T.M., Vance, A.L., van Buuren, T., Bostedt, C., Terminello, L.J., Fadley, C.S. *Rapid degradation of alkanethiol-based self-assembled monolayers on gold in ambient laboratory conditions* Surf. Sci., 2005. **576**: p. 188-196.
244. Munro, J.C. and C.W. Frank, *Adsorption of disulfide-modified polyacrylamides to gold and silver surfaces as cushions for polymer-supported lipid bilayers*. Polymer, 2003(44): p. 6335-6344.
245. Zhang, H.-L., Evans, S. D., Critchley, K., Fukushima, H. and Tamaki T. *Novel cyanoterphenyl self-assembly monolayers on Au(111) studied by ellipsometry, x-ray photoelectron spectroscopy, and vibrational spectroscopies* J. Chem. Phys., 2005. **122**: p. 224707.
246. Sako, E.O., Kondoh, H., Nakai, I., Nambu, A., Nakamura, T., Ohta, T. *Reactive adsorption of thiophene on Au(111) from solution*. Chemical Physics Letters, 2005. **413**: p. 267-271.
247. Lavrich, D. J., Wetterer, S. M., Bernasek, S. L. and Scoles, G. *Physisorption and Chemisorption of Alkanethiols and Alkyl Sulfides on Au(111)* J. Phys. Chem. B, 1998. **102**: p. 3456-3465.
248. Di Felice, R., A. Selloni, and E. Molinari, *A DFT study of cysteine adsorption on Au(111)*. J. Phys. Chem B, 2003. **107**: p. 1151.

249. Noh, J. and M. Hara, *Nanoscale observation of dissociative adsorption during self-assembly processes of dialkyl disulfides on Au(111)*. *Rinken Review*, 2001. **37**: p. 54-57.
250. Noh, J., et al., *Nanoscope Investigation of the Self-Assembly Processes of Dialkyl Disulfides and Dialkyl Sulfides on Au(111)*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2000. **104**: p. 7411-7416.
251. Vargas, M.C., et al., *Coverage-Dependent Adsorption of CH₃S and (CH₃S)₂ on Au(111): a Density Functional Theory Study*. *J. Phys. Chem. B*, 2001. **105**: p. 9509-9513.
252. Wackerbarth, H., et al., *Thiol- and disulfide-modified oligonucleotide monolayer structures on polycrystalline and single-crystal Au(111) surfaces*. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 2004. **8**: p. 474 - 481.
253. Garg, N., J.M. Friedman, and T.R. Lee, *Adsorption Profiles of Chelating Aromatic Dithiols and Disulfides: Comparison to Those of Normal Alkanethiols and Disulfides*. *Langmuir*, 2000. **16**: p. 4266-4271.
254. Jung, C., et al., *Self-assembled monolayers from organosulfur compounds: A comparison between sulfides, disulfides and thiols*. *Langmuir*, 1998. **14**: p. 1103.
255. Biebuyck, H.A., C.D. Bain, and G.M. Whitesides, *Comparison of organic Monolayers on polycrystalline Gold spontaneously assembled from solutions containing dialkyl disulfides or alkanethiols*. *Langmuir*, 1994. **10**: p. 1825-1831.
256. Enderlein, J., *A Theoretical Investigation of Single-Molecule Fluorescence Detection on Thin Metallic Layers*. *Biophysical Journal*, 2000. **78**: p. 2151-2158.
257. Chance, R., A. Prock, and R. Silbey, *Molecular Fluorescence and Energy Transfer Near Interfaces*. *Adv. in Chem. Phys.*, 1978. **37**: p. 1.
258. Alivisatos, A.P., D.H. Waldeck, and C.B. Harris, *Nonclassical behavior of energy transfer from molecules to metal surfaces: Biacetyl(3n*)/Ag(111)*. *Journal of Chemical Physics*, 1985. **82**(1): p. 541-547.
259. Rant, U., et al., *Excessive Counterion Condensation on Immobilized ssDNA in Solutions of High Ionic Strength*. *Biophysical Journal* 2003. **85**: p. 3858-3864.
260. Kelly SO, Barton JK, Jackson NM, McPearson LD, Potter AB, Spain EM, et al. *Orienting DNA helices on gold using applied electric fields*. *Langmuir*, 1998. **14**: p. 6781-6784.
261. Zhang, Z-L, Pang, D-W., Zhang, R-Y., Yan, J-W., Mao, B-W., and Qi, Y-P. *Investigation of DNA Orientation on Gold by EC-STM* *Bioconjugate Chem*, 2002. **13**: p. 104-109.
262. Tinland, B., et al., *Persistence Length of Single-Stranded DNA*. *Macromolecules*, 1997. **30**: p. 5763-5765.
263. Erts, D., et al., *Spatial and Mechanical Properties of Dilute DNA Monolayers on Gold Imaged by AFM*. *J. Phys. Chem. B*, 2003. **107**: p. 3591-3597.
264. Liebermann, T., et al., *Complement hybridization from solution to surface-attached probe-oligonucleotides observed by surface-plasmon-field-enhanced fluorescence spectroscopy*. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 2000. **169**(1-3): p. 337-350.
265. Stefani, F.D., *Técnicas basadas en la resonancia de plasmones superficiales. Detección y estudio de reacciones de hibridación de ADN en superficies*. *Rep. Argentina.*, 2001.

- 266. Demers, L.M., et al., *A Fluorescence-Based Method for Determining the Surface Coverage and Hybridization Efficiency of Thiol-Capped Oligonucleotides Bound to Gold Thin Films and Nanoparticles* Anal. Chem., 2000. **72**(22): p. 5535 -5541.
- 267. Hagan, M.F. and A.K. Chakraborty, *Hybridization dynamics of surface immobilized DNA*. Journal of Chemical Physics, 2004. **120**(10): p. 4958-4968.
- 268. Wilson, P.K., et al., *A novel optical biosensor format for the detection of clinically relevant TP53 mutations*. Biosensors & Bioelectronics, 2005. **20**(11): p. 2310-2313.
- 269. Wang, R., et al., *A new approach for the detection of DNA sequences in amplified nucleic acids by a surface plasmon resonance biosensor*. Biosen. Bioelectron, 2004b. **20**(3): p. 598-605.

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla I1. Clasificación de los biosensores según el receptor biológico.....	15
Tabla I2. Ventajas e inconvenientes de diferentes tipos de biosensores	32
Tabla I3. Resumen de las diferentes mutaciones y el número de.....	55
Tabla M1. Colección de secuencias de oligos usadas.....	65
Tabla M2. Secuencias portadoras de las mutaciones relativas	67
Tabla M3. Relación de cebadores.....	68
Tabla M4. Secuencias <i>tipo PCR</i> empleadas para la	69
Tabla R1. Porcentajes de recubrimiento para DNA-SH,.....	89
Tabla R2. Efecto en el recubrimiento del MCH sobre las	93

FIGURAS

Figura E1. Esquema de la estrategia empleada para la consecución de los objetivos.....	10
Figura I1. Esquema del funcionamiento básico de un biosensor	13
Figura I2. Principales tipos de biosensores según el receptor biológico	18
Figura I3. (arriba) Guía de ondas convencional. Se observa cómo el campo.....	21
Figura I4. Representación esquemática de la configuración de un sensor.....	25
Figura I5. a) Respuesta del sensor de SPR al cambio de índice de refracción.....	26
Figura I6. Imagen de una micropalanca típica empleada en biosensores.....	28
Figura I7. Esquema de un biosensor nanomecánico con sistema óptico de detección.....	30
Figura I8. Algunos formatos de detección de biosensores de ADN a) empleando marcajes fluorescentes b) Molecular Beacons y c) FREET	33
Figura I9. Esquema de las formas de inmovilización de ADN a través de SAMs por inmovilización directa de ADN funcionalizado (arriba) e indirecta (abajo).....	40
Figura I10. Esquema de la accesibilidad de la molécula complementaria en función del grado de empaquetamiento de la monocapa de ADN inmovilizada	41
Figura I11. Estructura de la proteína del BRCA-1 con los dominios más significativos.....	52

Figura M1. a) Esquema de la configuración y los principales componentes del biosensor SPR de Sensia. b) (<i>izda.</i>) Fotografías del biosensor y (<i>dcha.</i>) detalle de sus componentes (el módulo	72
Figura M2. Esquema del sistema experimental empleado, basado en una única.....	74
Figura M3. a) Imagen del ScanArray GSI Lumonics b) Escala de colores asociada.....	76
Figura M4. (Izquierda) Superficie irradiada con una fuente de fotones de alta.....	78
Figura R1. Comparativa de la señal de radiomarcaje de un ADN modificado.....	84
Figura R2. Efecto del MCH sobre los diferentes tipos de ADN modificado.....	85
Figura R3. (a) Señal de fluorescencia de la inmovilización de DNA-SH a.....	87
Figura R4. Espectro de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X. Se muestran.....	88
Figura R5. Espectros correspondientes al pico del S 2p para los tres tipos de.....	91
Figura R6. Espectros correspondientes al pico del S 2p para los tres tipos de.....	92
Figura R7. Adsorción de ADN no modificado y uno modificado con un.....	93
Figura R8. (a) Curvas representativas y (b) estadística de inmovilización.....	95
Figura R9. Hibridación y regeneración de la superficie de ADN. Se muestra.....	96
Figura R10. Representación de los valores de señal obtenidos por SPR en.....	97

Figura R11. Deflexión debida a la inyección de una disolución de secuencias.....	98
Figura R12. Esquema de las estrategias empleadas para mejorar la accesibilidad.....	99
Figura R13. Comparativa de la señal de hibridación para diferentes concentraciones.....	100
Figura R14. (a) Señal de hibridación tras inmovilizar diferentes relaciones (μM).....	101
Figura R15. Comparativa con SPR de la señal de hibridación considerando una.....	102
Figura R16. Estadística de la señal de deflexión debida a secuencias complementarias.....	103
Figura R17. Optimización de la accesibilidad vertical de la secuencia complementaria.....	104
Figura R18. Señal de hibridación en SPR comparativa en monocapas con y sin.....	104
Figura R19. Señales de hibridación en biosensores nanomecánicos con y sin.....	105
Figura R20. Curvas de hibridación a diferentes concentraciones de complementario.....	106
Figura R21. Estudios de hibridación de la secuencia de 25 mer en diferentes.....	108
Figura R22. Curva de calibrado para la secuencia complementaria y las portadoras.....	109
Figura R23. Curvas de calibrado de hibridación de secuencia complementaria.....	110
Figura R24. Detección de una cantidad de complementario tipo PCR del fenotipo.....	111

Figura R25. Señal de hibridación para secuencias del fenotipo mutante (M) y.....	112
Figura R26. a) Detección de la secuencia 916delTT en concentración 500 nM.....	113
Figura R27. Medida en continuo para una hibridación 125 nM de ambos fenotipos.....	115
Figura R28. Curva de calibrado en formato bi-analito para las secuencias.....	115
Figura R29. Curva de hibridación 125 nM para la secuencia 185delAG (izda.).....	116
Figura R30. a) Relación de proporciones de secuencias inmovilizadas para.....	117
Figura R31. Curva de hibridación 125 nM en configuración 2:3 μ M para las.....	118
Figura R32. Señal de hibridación 125 nM en SSC5X-formamida 5% para.....	119
Figura R33. Ejemplo de las curvas de hibridación obtenidas para la concentración.....	120
Figura R34. Señal de hibridación 125 nM para diferentes proporciones de secuencias.....	121
Figura R35. Curvas por triplicado de detección de secuencias en concentración.....	122
Figura D1. Modelo tridimensional representativo de la configuración espacial de.....	125
Figura D2. Curva representativa de una interacción donde se muestra el tiempo.....	127
Figura D3. Esquema que muestra el modelo de lo que	131
Figura D4. Principales estrategias para la detección de	141
Figura C1. a) Fotografía de dispositivo multibiosensor.....	154

Figura C2. Imágenes de un dispositivo interferométrico Mach155

CUADROS

Cuadro I1. Tipos de mutaciones asociadas con el cáncer.....47

PUBLICACIONES

1. ARTÍCULOS

Publicados

1. K. Zinoviev, L.G. Carrascosa, J. Sánchez del Río, B. Sepúlveda, C. Domínguez and L.M. Lechuga (2008) **Silicon Photonic Biosensors for "lab-on-a-chip" applications**. (Invited paper, Special Issue on Silicon Photonics). *Advances in Optical Technologies*. In Press.
2. Carrascosa *, L.G., M. Calleja*, A. Tarín, and J. Tamayo. (2006) **Study of the Adsorption of Sulfur-Derivatized Single Stranded DNA on Gold by Atomic Force Microscopy and the Cantilever Bending Technique**. *Sensor Letters*. 4(6), 275-280. (* both authors contributed equally to the work).
3. Lechuga, L.M., J. Tamayo, M. Alvarez, L.G. Carrascosa, A. Yufera Garcia, R. Doldan Lorenzo, E. Peralias Macias, A. Rueda Rueda, J.A. Plaza, K. Zinoiev, C. Domínguez, A. Zaballos, M. Moreno, C. Martinez, D. Wenn, C. Harris, C. Bringer, V. Bardinal, T. Camps, and C. Vergnenègre. (2006) **A Highly Sensitive Microsystem Based on Nanomechanical Biosensors for Genomics Applications**. *Sensors and Actuators B-Chemical*. 118(1-2), 2-10. *Article highlighted in the Nanotech News of the National Cancer Institute (US) and in the News Web section of the Nano Science and Technology Institute (NSTI)*.
4. Carrascosa, L.G., M. Moreno, M. Álvarez, and L.M. Lechuga. (2006) **Nanomechanical biosensors: a new sensing tool**. *Trends in Analytical Chemistry (TRAC)*. 25, 196-206.
5. Alvarez, M., L.G. Carrascosa, M. Moreno, A. Calle, A. Zaballos, L.M. Lechuga, C. Martinez-A, and J. Tamayo. (2004) **Nanomechanics on the formation of DNA self-assembled monolayers and hybridisation on microcantilevers**. *Langmuir*. 20(22), 9663-9676.

En preparación

1. Carrascosa, L.G., A. Calle, and L.M. Lechuga. (2008) **Improving DNA mutations analysis by means of SPR biosensing: Application to early inherited breast cancer detection**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry (ABC)*. En preparación (por INVITACIÓN).
2. Carrascosa, L.G., M. Moreno, A. Calle, and L.M. Lechuga. (2008) **Multi-analyte DNA SPR biosensing for early detection of mutations related to inherited breast cancer**. En preparación.
3. Carrascosa, L.G., E. Mauriz, A. Calle, and L.M. Lechuga. (2008) **Applications of photonic micro/nanobiosensors**. *Journal of Materials Chemistry*. En preparación (por INVITACIÓN).

4. Carrascosa *, L.G., L. Martinez*, Y. Huttel, E. San Román, and L.M. Lechuga. (2008) **DNA self-assembly on gold for biosensing purposes: Addressing the role of thiol linker type on final monolayer properties.** En preparación, (* both authors contributed equally to the work).

2. CAPÍTULOS DE LIBRO

1. Álvarez, M., L.G. Carrascosa, J.A. Plaza, K. Zinoviev, and L.M. Lechuga. (2007) **Cantilever biosensors.** *Series "Methods in Biotechnology". Humana Press, USA.* In Press.
2. Carrascosa, L.G., E. Mauriz, J. Sánchez del Río, M. Moreno, K. Zinoviev, A. Calle, C. Domínguez, and L.M. Lechuga. (2007) **Portable nanobiosensor platforms for ultrasensitive multidetection of biological warfare agents in real time** In **Commercial and Pre-commercial Cell Detection Technologies for Defence against Bioterror - Technology, Market and Society.** *NATO Security through Science. Series-B: Physics and Biophysics. Ed.L.M. Lechuga. Dordrecht, The Netherlands.*
3. Lechuga, L.M., L.G. Carrascosa, M. Moreno, and K. Zinoviev. (2006) **Nanodevices for Biosensing: design, fabrication and applications.** In: *Nanodevices for Life Sciences in Book Series on Nanotechnology for Life Sciences.* Ed. C. Kumar, Wiley-VCH: *Book Series on Nanotechnology for Life Sciences.* 4, 317-344.

3. PROCEEDINGS

1. Carrascosa, L.G., M. Moreno, A. Calle, and L.M. Lechuga. (2007) **SPR biosensing for early detection of mutations related to inherited breast cancer.** *Proceedings of IBERSENSOR 2006.*
2. Sánchez del Río, J., L.G. Carrascosa, M. Moreno, F.J. Blanco, J. Berganzo, A. Calle, C. Domínguez, and L.M. Lechuga. (2007) **Lab-on-a-chip platforms based on highly sensitive nanophotonic Si biosensors for single nucleotide DNA testing.** *Proceed. SPIE Photonics West, 2007.* 6477, 64771B-1 - 64771A-9.
3. Carrascosa, L.G., M. Álvarez, J. Tamayo, A. Calle, and L.M. Lechuga. (2003) **Development of a biosensor device based on microcantilevers for genomic and environmental applications.** *Proceedings of CDE '03, Conferencia de Dispositivos Electrónicos.*
4. Álvarez, M., L.G. Carrascosa, J. Tamayo, A. Calle, and L.M. Lechuga. (2003) **Nanomechanics for specific biological detection.** *Proceedings of SPIE (The International Society for Optical engineering). Microtechnologies for the New Millennium 2003: Nanotechnologies.* 5118, 197-206.

4. CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

Orales Invitadas

1. **1st Workshop on Nanomechanical Sensors.** Madrid (Spain), 15-16 November 2004. **Oral invited:** "Integrated Opto-Nanomechanical biosensor for functional genomic analysis (OPTONANOGEN)". J. Tamayo, M. Álvarez, L.G.Carrascosa, L.M. Lechuga, J.A. Plaza, K. Zinoviev, C.Domínguez, Al Yufera, A. Rueda, A. Zaballos M. Moreno, C. Martinez-A, V. Cardinal, C. Vergnerêgre, C. Fontaine, C. Hughes, D. Wenn, V. Díaz and A. Bernard.
2. **SMCTSM. XXV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales.** 26-30 Septiembre, Zacatecas, México, 2005. **Oral Invited:** "Nanomechanical transducers based on MEMS technology for highly sensitive biosensor devices". L.M. Lechuga, K. Zinoviev, L.G. Carrascosa, M. Moreno, J.A. Plaza and C. Domínguez
3. **NATO Advanced Research Workshop: "Commercial and Pre-commercial Cell Detection Technologies for Defence against Bioterror – Technology, Market and Society".** Brno, Czech Republic, 3-6 September 2006. **Oral invited:** "Portable nanobiosensor platforms for ultrasensitive multidetection of biological warfare agents in real time" L.M. Lechuga, L.G. Carrascosa, E. Mauriz, J. Sánchez del Río, M. Moreno, K. Zinoviev, A. Calle and C. Domínguez.
4. **I Workshop sobre Nanotecnología Analítica.** Córdoba, 16 y 17 Julio 2007. **Oral invited:** "Biosensores Nanomecánicos". L.G. Carrascosa, C. Domínguez and L.M. Lechuga.
5. **SMCTSM. XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales.** 24-28 Septiembre, Oaxaca, México, 2007. **Oral Invited:** "Nanobiosensors based on MEMS technology for lab-on-a-chip Microsystems". K. Zinoviev, L.G. Carrascosa, B. Sepúlveda, A. Calle, C. Domínguez and L. M. Lechuga

Orales

1. **DIO Scientific retreat 2002 /** Centro Nacional de Biotecnología (CSIC). Madrid (Spain). "Nanomechanical biosensors for nucleic acid detection". L.G. Carrascosa, M. Álvarez, J. Tamayo, A. Calle, L. M. Lechuga, K. Harshman and C. Martínez-A.
2. **SPIE (Symposium on Microtechnologies for the New Millennium 2003).** Las Palmas de Gran Canarias (Spain), 2003. "Nanomechanics for specific biological detection". M. Álvarez, L.G.Carrascosa, J. Tamayo, A. Calle and L.M. Lechuga.
3. **Oxford 2003 Scanning Probe Microscopy, Sensors and Nanostructures.** Oxford (UK),2003. "Biomolecule detection based on the nanomechanical response of a microcantilever: Bending and dynamic

- Methods". M. Álvarez, L.G.Carrascosa, J. Tamayo, A. Calle and L.M. Lechuga.
4. **Oxford 2003 Scanning Probe Microscopy, Sensors and Nanostructures.** Oxford (UK), 2003. "Nanomechanics for biochemical detection in liquids". M. Álvarez, L.G.Carrascosa, J. Tamayo, A. Calle and L.M. Lechuga.
 5. **TEDA 2004 Scanning Probe Microscopy, Sensors and Nanostructures.** Beijing(China), Junio 2004. "Characterization of the immobilization of sulfur-derivatized DNA for Nanomechanical Biochips". M. Álvarez, L.G. Carrascosa, M. Calleja, J. Tamayo, M. Moreno. A. Boisen and L. M. Lechuga.
 6. **International Symposium on Sensor Science (I3S).** Nanking (China), Junio 2004. "Development of biosensors based on Nanomechanics and its applications for protein and DNA detection". J. Tamayo, M. Álvarez, L.G.Carrascosa, M. Calleja, M. Moreno and L. M. Lechuga.
 7. **IBERSENSOR'2004. 4nd IberoAmerican Conference on Sensors.** Puebla (México), Octubre 2004. "Nanomechanics for biochemical detection in liquids". M. Álvarez, L.G. Carrascosa, M. Calleja, M. Moreno, J. Tamayo and L.M. Lechuga.
 8. **1st Workshop on Nanomechanical Sensors.** Madrid (Spain), Noviembre 2004. "Study of the nanomechanical response during molecular recognition". M. Álvarez, L.G. Carrascosa, M. Calleja, A. Calle, M. Moreno, L.M. Lechuga and J. Tamayo.
 9. **IBERSENSOR'2006. 5nd IberoAmerican Conference on Sensors.** Montevideo (Uruguay), Septiembre 2006. "Integrated Photonic biosensor for high sensitivity DNA testing". J. Sánchez del Río, M. Moreno, L.G. Carrascosa, B. Sepúlveda, A. Calle, C. Domínguez and L. M. Lechuga.
 10. **IBERSENSOR'2006. 5nd IberoAmerican Conference on Sensors.** Montevideo (Uruguay), Septiembre 2006. "Biosensores de resonancia de plasmón superficial como herramientas de análisis genético en la detección precoz de cáncer de mama hereditario". L.G. Carrascosa, M. Moreno, A. Calle and L. M. Lechuga.
 11. **18th International Conference on Optical Fiber Sensors (OFS-18).** Cancún, México., Octubre 2006. "Photonic micro/nanobiosensors for early diagnosis of diseases". L.M. Lechuga, J. Sánchez del Río, B. Sepúlveda, M. Moreno, L.G. Carrascosa, K. Zinoviev, A. Calle and C. Domínguez.
 12. **2008 International Conference on Nanoscience and Nanotechnology.** Melbourne (Australia), Febrero 2008. "Photonic Nanobiosensor platforms for label-free detection of single mutations in DNA". Laura G. Carrascosa, Borja Sepúlveda, Kirill Zinoviev, Ana Calle, Carlos Domínguez and L.M. Lechuga.

Posters

1. **TNT'2002 (Trends in Nanotechnology).** Santiago de Compostela (Spain), 2002. "Development of a nanomechanical biosensor for detection of oligonucleotide hybridization". M. Álvarez, L.G. Carrascosa, J. Tamayo, A. Calle and L.M. Lechuga. Póster (AWARDED)
2. **Ibersensors'2002.** Lima (Perú). " Biosensores Nanomecánicos para la detección de ácidos nucleicos". M. Álvarez, L.G. Carrascosa, J. Tamayo, A. Calle and L.M. Lechuga
3. **CDE'03 (Conferencia de Dispositivos Electrónicos).** Calella de Mar, Barcelona, 2003. "Development of a biosensors device based on microcantilevers for genomic and environmental applications". L.G. Carrascosa, M. Álvarez, J. Tamayo, A. Calle and L.M. Lechuga.
4. **CDE'03 (Conferencia de Dispositivos Electrónicos).** Calella de Mar, Barcelona, 2003. "Integrated prototype of nanomechanical biosensor based on silicon technology for biosensing applications". J. Tamayo, A. Calle, M. Álvarez, L.G. Carrascosa and L.M. Lechuga; J.A. Plaza, A. Llobera, J. Esteve and C. Domínguez; A. Yufera, G. Leger, A. Rueda and J.L. Huertas; K Harsman and C. Martínez-A.
5. **Oxford 2003 Scanning Probe Microscopy, Sensors and Nanostructures.** Oxford (UK), 2003. "Characterization of DNA immobilization over gold surfaces for biosensing applications". L.G.Carrascosa, M. Álvarez, J. Tamayo, A. Calle , L.M. Lechuga, V. Díaz, A. Zaballos and C. Martínez-A.
6. **TEDA 2004 Scanning Probe Microscopy, Sensors and Nanostructures.** Beijing (China), Junio 2004. "Characterization of the immobilization of sulfur-derivatized DNA for Nanomechanical Biochips". L.G. Carrascosa, M. Álvarez, M. Moreno, J. Tamayo, M. Calleja, and L. M. Lechuga.
7. **1st Workshop on Nanomechanical Sensors.** Madrid (Spain), Noviembre 2004. "Nanomechanical characterization of the surface stress of gold surfaces during the formation of DNA self-assembled monolayers". L.G. Carrascosa, M. Álvarez, J. Tamayo, C. Martínez-A and L.M. Lechuga.
8. **EUROSENSORS'05.** Barcelona (Spain), Septiembre 2005. "Nanomechanical Biochips For Genomics And Proteomics". J. Tamayo, M. Álvarez, L.G. Carrascosa, K. Zinoviev, J.A. Plaza, D. Ramos, M. Moreno, M. Calleja, J. Mertens, A. Calle, C. Domínguez and L.M. Lechuga.
9. **Acto de celebración "Ochoa, 100 años: mirando al futuro".** Madrid (Spain), Noviembre 2005. "Nanobiosensor devices for early detetcion of cancer and infectious agents". M. Moreno, L.G. Carrascosa, M. Álvarez, J. Sánchez del Río, B. Sepúlveda, E. Mauriz, J. Treviño, A. Calle and L.M. Lechuga.
10. **EUROPT(R)ODE VIII (Eighth European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors).** Tübingen (Germany), Abril 2006. "A high sensitive DNA biosensor based on integrated MZI CMOS compatible". J. Sánchez del Río, M. Moreno, L.G. Carrascosa, B. Sepúlveda, A.Calle, C. Domínguez and L. M. Lechuga.

11. **IBERSENSOR'2006. 5nd IberoAmerican Conference on Sensors.** Montevideo (Uruguay), Septiembre 2006. "A highly sensitive microsystem based on nanomechanical biosensors for genomics applications". M. Moreno, M. Alvarez, L.G. Carrascosa, J.A. Plaza, K. Zinoviev, C. Domínguez and L. M. Lechuga.
12. **SPIE Photonics West (The International Society for Optical Engineering). Silicon Photonics Symposium.** San José (California, USA), Enero 2007. "Lab-on-a-chip platforms based on highly sensitive nanophotonic Si biosensors for single nucleotide DNA testing". J. Sánchez del Río, L.G. Carrascosa, M. Moreno, F.J. Blanco, J. Berganzo, A. Calle, C. Domínguez and L. M. Lechuga.
13. **EUROPT(R)ODE IX (Nineth European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors).** Dublin (Ireland), Abril 2008. "Multidetecction of different single DNA mutations using SPR biosensing". L. G. Carrascosa, A. Calle and L.M. Lechuga.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de Tesis es fruto de muchos años de esfuerzo. Durante este tiempo ha habido muchos momentos difíciles, otros muy difíciles y muchos buenos, muy buenos. Momentos, que he tenido el gran placer de compartir con un conjunto de personas sin las cuales los momentos difíciles y los muy difíciles se habrían hecho insoportables y los muchos buenos, inexistentes. Por eso no puedo dejar de sacar de mi mente esa lista de personas con las que he compartido todos esos ratos y experiencias, y a las que debo un GRACIAS enorme por haberme permitido llegar hasta aquí.

Mi primer agradecimiento es sin duda para Laura Lechuga, mi directora de Tesis. Laura, te debo un gracias, no grande, gigante. Gracias por dirigirme en mi carrera científica, por contagiarme el gusto por investigar y por ser, además de “la jefa”, una amiga y un apoyo indispensable. No exagero si digo que sin ti, hoy no estaría leyendo la Tesis. Gracias por la oportunidad que me diste hace unos años para seguir mi Tesis doctoral contigo y por la confianza que siempre has depositado en mí y en mi capacidad para dedicarme a la investigación. ¡Solo tú sabes, por lo que hemos pasado con los cantilevers! Tengo magníficos recuerdos de un montón de ratos, viajes y anécdotas contigo. Espero acumular muchas más ahora en Barcelona. Gracias también por tu paciencia y dedicación corrigiendo la Tesis. ¡Menuda maratón nos hemos pegado!

En segundo lugar quiero agradecer a todo mi grupo de trabajo (los que están y los que ya se fueron): Mar, Borja, Ana Calle, David Regatos, David Fariña, Bert, Conchi, Elba, Fran, Miguel, Tarín, Elena, Juan, Fernando, Laura Falcón, Orlando, Ernest, Ana, Ester, Eva, Carlos Domínguez, Kirill, Andreu y Victor por el increíble sostén que han supuesto para mí tanto en lo profesional como en lo personal. Siempre he encontrado en ellos apoyo y ayuda cuando les he necesitado. Guardo con mucho cariño todos esos ratos que nos hemos pasado juntos los jueves por Madrid, esas noches de la Lupe y también, como no, alguna que otra noche por Tres Cantos y ahora también por Barcelona.

De forma particular quiero dar las gracias a Mar y Borja, mis infatigables compañeros de batalla en esta Tesis y por encima de todo, grandes amigos.

Mar, ¡cuántos grandes momentos hemos pasado! Gracias por hacer más llevadero ese nano-infierno llamado cantilever. Si alguien sabe de lo qué hablo esa eres tú. ¡Qué grande ese congreso de Oxford con Marta y Violeta! Eres genial, te echo mucho de menos y estoy deseando que vuelvas de una

vez de Australia. Os estoy esperando a ti y a Carlos con los pies de gato ¡en la mano!

Borjís, a ti también te debo un “gracias” de los grandes. ¡Me has ayudado en tantas cosas! Eres fantástico. Inolvidables la cantidad de historias compartidas en Tres Cantos y ahora en Barcelona, los ratos de desestrés liberador, las palabras de ánimo en los momentos de bajón... y por supuesto ¡esas estupendas Guinness de Dublín! Gracias también por tu esfuerzo con las correcciones de la Tesis.

No quiero olvidarme tampoco de mis *magneto-electrónicos* (David)². Gracias por poner una sonrisa a tantas tardes de agobio. No se me olvidarán los ratos de café descompresor junto con Bert en los que no podía dejar de reír mientras contabais los últimos sketches de Muchacada Nui. David, no desesperes, algún día el efecto magneto dará su fruto y te podré pasar unos ADNs para que te vuelvas la mitad de loco que yo midiéndolos. Fariña, pedazo de curro que nos pegamos con el video de la jefa. ¡Y lo que nos pudimos reír! Memorable. Gracias también por supuesto, por todo el soporte informático, ¡eres insustituible! Bert, eres el holandés-granaíno-catalán mas salao que he conocido. También gracias por participar de esos momentos descompresores y ayudar en todas las pequeñas cosas.

Quiero dar un gracias enorme a Ana Calle. Ana, ¡sin ti el laboratorio no es igual! No sé qué habría hecho sin ti, con tanto como hemos tenido que guerrear con los sensores. Muchas gracias por toda la ayuda que me has ofrecido, en especial durante la optimización del multianálisis de ADN.

Elena, mil gracias por toda tu ayuda. Sin ti tampoco habría podido terminar esta Tesis, más aún en esa recta final tan sumamente estresante. Gracias por ayudarme con los últimos experimentos. Prometo volver a la capoeira. Ya verás, dentro de nada le metes una paliza a Anderson!

Juan, te iba a decir que ahora que tú también terminas la Tesis, por fin te vas a librar del SPR, pero al final te vas para ¡seguir trabajando en SPR! Te deseo mil suertes en tu nueva etapa profesional. No me olvidaré de un montón de grandes momentos que hemos pasado. ¡Cómo vas a echar de menos mis barbacoas!

Conchi, gracias también a ti, no sólo por la cantidad de ayuda que me has dado durante los miles de papeles burocráticos, que en mi desastrosa dejadez siempre me olvidaba de rellenar, si no por lo amiga que has sabido ser. ¡Cuántos ratos hablando de nuestra afición a los gatos!

Miguel, también mil gracias a ti por los innumerables momentos de apoyo que me has ofrecido y toda la ayuda en la parte “BIO”. Mucha suerte en tu nueva etapa con esa pedazo de empresa. ¡Te va a ir genial!

Quiero agradecer también al personal del IMM por la ayuda que me han prestado en los diferentes momentos de la Tesis. Guardo muy buen recuerdo de muchos ratos de mi estancia allí. Quiero agradecer a todos con los que he compartido tantísimos de esos ratos...las horas de la cocina, las

partidas de fútbol al final de las tardes de trabajo... Todos (Dani Granados, Boubeta, Violeta, Marta, Ferran, Chemi, Ripi, Chon, PG, Iván, Raquel, Paco, Ramsés, Juan B, Johan, Antonio, entre muchos otros) han contribuido a crear un ambiente relajado y divertido. Inolvidables también esas cervezas y mojitos en casa de Chon... y ese fantástico corte de pelo que le di a PG en una noche un tanto surrealista... PG, ¡espero que algún día me perdones los trasquilones!

Ferrán, espero que la vida malagueña te trate bien ahora que has salido del IMM. Gracias por ser tan buena gente y amigo, por compartir las penas de la Tesis y tantos buenos ratos.

Del IMM, quiero mencionar también al personal de administración, en especial a Margarita, por ayudarme a pelear tantos pedidos perdidos en Aduanas y por la yuda prestada con todos los trámites y papeleos que han surgido durante la Tesis.

Gracias también a todo el personal del CIN2 y en especial a la sección catalana del grupo (Xavi, tú como si también fueras de biosensores!) por la acogida que me habéis dado a mi llegada a Barcelona y por hacer que ésta sea mucho más familiar y relajada. Gracias por esas birrillas del final del día, a las que la Tesis apenas me dejaba ir, pero que siempre resultaban liberadoras. Prometo que a partir de ahora me apuntaré más a menudo.

En el plano más personal mi agradecimiento va por supuesto para mi familia y amigos. Empezando por los más cercanos, hasta los más lejanos, todos han ayudado, desde los imprudentes que insistían en enterarse del tema de la Tesis y se tragaban unas horillas de charla sobre biosensores y ADN (¡parece mentira que no me conozcáis!) hasta los que constantemente preguntaban que cuándo estaría terminada. Ya veis, ha tardado, pero al final, ¡ahí está! Gracias, porque en ocasiones habéis sabido tener más confianza en este trabajo que yo misma. ¿Quién puede pedir más?

Quiero agradecer a mi familia y en especial a mis padres, a quienes nunca podré pagar todos sus desvelos y todo el cariño y esfuerzo que han dedicado para que hoy este aquí. Gracias por transmitirme el gusto por estudiar, por enseñarme a no conformarme y llegar más allá. Mama, papá, después de daros tanto la tabarra con mis problemas derivados de la Tesis, mis angustias y agobios con los experimentos, espero que después de escuchar la charla por fin entendáis algo de ese extraño mundo de los sensores y el ADN del que tanto os he hablado. A mis hermanos, Sara, Juanjo, Franky, y mis “cuñaos”, gracias por ser tan increíbles y darme tanto apoyo y cariño en tantos momentos.

Quiero dar un gracias especial a mi tía Sole, que sé que estaría hoy disfrutando muchísimo de este día conmigo. Donde quiera que estés, gracias. Siempre me has transmitido mucha confianza en mi trabajo y una gran ilusión y pasión por la lectura, la cultura, los estudios... Te echo mucho de

menos. Esta Tesis va también por ti. Ojala que algún día consigamos encontrar solución a esta maldita enfermedad, que es el cáncer.

A Luís, Begoña, Iñaki, Lara, Begoñita, Guillermo y Zhora, mil gracias por todo vuestro cariño y entusiasmo. Gracias por todo el sostén y la confianza que siempre me habéis transmitido. No tengo palabras. Sois geniales.

Quiero dar gracias también a mis amigos de cerca y de lejos, especialmente a Nachete, Victín, Manu, Bruno, Darío, Diana, Marta, Andrea y Mari Jose.

Nachete, ¡te echo muchísimo de menos! Tú has sido siempre mi gran sufridor y gran amigo como nadie. Eres fantástico. Gracias por los miles de ánimos que siempre me has transmitido incluso ahora que estás en Seattle. ¡Qué haríamos sin el Messenger!

Victín, mi chico 9b+!! Mil gracias por ser tan buena gente y compartir también un montón de momentos y pataletas de la Tesis. Estoy deseando ver ese 600 colgado del RAM!! Manu, gracias a ti, también. Ánimo con esa tesis que estás sufriendo. No desesperes, hay luz al final del tunel.

A Andrea y Mari José, por ser mis grandes amigas. Gracias por estar siempre ahí, en todos los momentos importantes. Sois grandes.

Finalmente, quiero dedicar un espacio especial a la persona que comparte mis días y mis noches, mis alegrías y tristezas... Gerardo, das color y sabor a mi vida. Eres la persona más especial que pude escoger y la palabra “gracias” se me queda pequeña para decirte lo que siento. Te quiero. Gracias por acompañarme en este camino, por transmitirme la ilusión cuando me faltaba y por compartir la alegría del día a día. No sé qué haría sin ti.

Sé que me dejo muchos nombres por escribir, pero os aseguro que todos tenéis un huequito en esa lista de agradecimientos y mucho me temo que si sigo sacando nombres de la lista más de uno me va a llamar pesada.

La verdad es que esta costumbre “literaria” de expresar agradecimientos al terminar un trabajo escrito no se entiende bien hasta que se ha atravesado el trance de la Tesis doctoral. La felicidad por la obra terminada, y el alivio por poner punto y final a una empresa que hipoteca tantas horas de la vida, resultan en agradecimientos, mucho más que retóricos hacia quienes lo han hecho posible.

A todos, GRACIAS.

